

Struktur und Eigenschaften des Farbstoffes in Bläuepilzen

Patrizia Zink

Disbui. München

1989

Struktur und Eigenschaften des
Farbstoffes in Blauwäldchen

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Struktur und Eigenschaften des Farbstoffes in Bläuepilzen

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Forstwissenschaft

an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Patrizia Zink

aus Wiedenzhausen

München
1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Fengel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Schütt
3. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Zenk

Tag der mündlichen Prüfung: 17.2.1989

Für William

Für William

V O R W O R T

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1985-1988 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. D. Fengel am Institut für Holzforschung, Abteilung Holzchemie und Ultrastruktur-forschung, der Universität München.

Herrn Prof. Dr. D. Fengel bin ich für die großzügige Unterstützung und wissenschaftliche Förderung der Arbeit sowie das mir jederzeit entgegengebrachte große Vertrauen zu besonderem Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Dr. habil. G. Wegener für die anregende wissenschaftliche Zusammenarbeit und seine freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. M. Stoll danke ich für die fachlichen Diskussionen und seine Hilfsbereitschaft.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die Zusammenarbeit im Labor, ganz besonders bei Frau M. Wenzkowski für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, bedanken.

Ferner bin ich Frau Dr. H. v. Aufsess und ihren Mitarbeiterinnen für die vielen wertvollen Hinweise und die Überlassung von Photomaterial dankbar.

Allen Institutsangehörigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, spreche ich an dieser Stelle meinen Dank aus.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Dr. habil. M. Eulitz, Institut für Hämatologie der GSF München für die Durchführung der Aminosäureanalysen, bei Herrn PD Dr. Dr. habil. F. Kreißl, Anorganisch-chemisches Institut, Lehrstuhl für anorganische Chemie I der Technischen Universität München, für die Anfertigung der Massenspektren sowie bei Herrn Dr. H. Schübel, Institut für Pharmazeutische Biologie, für die Aufnahme der NMR-Spektren bedanken.

Die Arbeit wurde im Rahmen eines DFG-Forschungsvorhabens Fe 136/9-1 finanziell unterstützt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Stand der Forschung	3
3. Aufgabenstellung	10
4. Beschreibung der untersuchten Pilze	11
4.1. Taxonomie des Genus CERATOCYSTIS	11
4.1.1. Geschichte und Allgemeines	11
4.1.2. Morphologie von Ceratocystis	12
4.1.3. Charakteristika der Kultur	14
4.2. Taxonomie des Genus ALTERNARIA	15
4.2.1. Geschichte und Allgemeines	15
4.2.2. Morphologie von Alternaria	16
4.2.3. Charakteristika der Kultur	18
5. Material und Methoden	19
5.1. Kulturbedingungen	19
5.2. Mikroskopische Untersuchungen	19
5.2.1. Lichtmikroskopie	19
5.2.2. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	19
5.2.3. Raster-Elektronenmikroskopie (REM)	19
5.3. Extraktionen	20
5.3.1. Extraktion der Pigmente	20
5.3.2. Extraktion weiterer Bestandteile	20
5.4. Spektroskopische Methoden	22
5.4.1. UV/VIS-Spektroskopie	22
5.4.2. IR-Spektroskopie	22
5.4.3. NMR-Spektroskopie	22
5.4.4. Massenspektroskopie	22
5.5. Elementaranalyse	22
5.6. Bestimmung der funktionellen Gruppen der Pigmente	23
5.6.1. Methoxylbestimmung	23
5.6.2. Simultanbestimmung der Carboxyl- und phenolischen OH-Gruppen	23
5.6.3. Bestimmung der Gesamt-OH-Gruppen	24
5.6.4. Carbonylgruppenbestimmung	24
5.6.5. Ermittlung der Chinongruppen	25

	Seite
5.7. Chemische Modifizierung und Spaltung der Polymere	26
5.7.1. Reduktion mit NaBH_4	26
5.7.2. Oxidation der Pigmente	26
5.7.3. Alkalifusion	26
5.8. Untersuchungen der Spaltprodukte und der Stoffe im Acetonextrakt	27
5.8.1. Chromatographische Methoden	27
5.8.1.1. Dünnschichtchromatographie	27
5.8.1.2. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	28
5.8.1.3. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	28
5.9. Untersuchung weiterer Bestandteile des Polymers	28
5.9.1. Bestimmung des Proteinanteils	28
5.9.1.1. Hydrolyse und Aminosäuren-Analyse	28
5.9.1.2. Elektrophoretische Abtrennung der Proteinbande vom Polymer	29
5.9.2. Bestimmung des Kohlenhydrat-Gehaltes	29
5.9.3. Bestimmung des Aschegehaltes und der Aschezusammensetzung	30
5.10. Synthese der Vergleichssubstanzen	30
5.11. Versuche an Holzstückchen	31
5.11.1. Künstliche Infizierung des Holzes mit <i>C. coerulescens</i> und <i>A. alternata</i>	31
5.11.2. Imprägnierung von Kiefernspiltholzklötzchen mit Melaninen	31
6. Ergebnisse	32
6.1. Mikroskopische Untersuchungen	32
6.2. Chemisch-analytische Untersuchungen	45
6.2.1. Spektroskopie	46
6.2.1.1. UV/VIS-Spektroskopie (190-800 nm)	46
6.2.1.2. Infrarot-Spektroskopie (4000-450 cm^{-1})	48
6.2.1.3. Kernresonanzspektroskopie (^1H - und ^{13}C -NMR)	56
6.2.1.4. Massenspektroskopie	63

III

	Seite
6.2.2. Daten aus der Elementaranalyse	67
6.2.3. Bestimmung der funktionellen Gruppen	70
6.2.4. Charakterisierung der proteinartigen Komponente	72
6.2.5. Zuckerbestimmung	74
6.2.6. Bilanz der elementaren Zusammensetzung der Polymere	75
6.3. Charakterisierung und Identifizierung der Spaltprodukte nach der Alkalifusion und der Permanganatoxidation	76
6.3.1. Dünnschichtchromatographie	76
6.3.2. HPLC	77
6.4. Charakterisierung des Acetonextraktes	79
6.4.1. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	79
6.5. Künstliche Infizierung und Imprägnierung von Kiefernspiltholzklötzchen	80
7. Diskussion	82
8. Schlußbetrachtung	96
9. Zusammenfassung	97
10. Literatur	102



1. EINLEITUNG

Holz beeindruckt immer wieder durch seine weite Verbreitung, seine leichte Bearbeitbarkeit, seine große Festigkeit bei geringem Gewicht und durch seine verschiedenartige Struktur, Farbe und Schönheit. Weiterhin ist Holz ein nachwachsender Rohstoff, dessen Eigenschaften durch die Standortwahl, durch Erziehungsmaßnahmen und durch die Wahl des Erntealters in gewissen Grenzen steuerbar sind. Doch neben all diesen Vorteilen ist die Verarbeitung und der Gebrauch des Rohstoffes Holz aus mannigfaltigen Gründen eingeschränkt. Zum einen gibt es Holzfehler, die im Aufbau des Baumes begründet sind, wieder andere Holzfehler sind auf die lange Wachstumszeit mit all ihren Gefährdungen oder auf nachträglich unerwünschte Veränderungen im Holzkörper zurückzuführen.

Holzverfärbungen nehmen eine wirtschaftlich bedeutsame Stellung ein. Über ihre Ursachen liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Neben biotischen Ursachen können abiotische Faktoren ebenso zu einer Verfärbung im Holz führen. Nicht immer ist es möglich einen deutlichen Trennstrich zwischen biotischen und abiotischen Holzverfärbungen zu ziehen, da eine hohe relative Luftfeuchtigkeit, Temperaturen um 20-30°C und Luftzutritt bei der Entstehung von Verfärbungen im lagernden Holz sowohl für Mikroorganismen als auch für rein abiotische, chemische Umsetzungen in den Holzzellen optimale Bedingungen schaffen. Holzverfärbungen, die durch die künstliche Holz Trocknung hervorgerufen werden (Kollmann et al., 1951; Wegener und Fengel, 1988) und Holzverfärbungen verschiedener Laubhölzer durch Eisensalzlösungen (Sandermann und Lüthgens, 1953; Koljo, 1957) sind nachgewiesen worden. Ebenfalls als gesichert gelten Verfärbungen biotischen Ursprunges durch braungefärbte Hyphen von Pilzen sowie durch lösliche von Mikroorganismen abgegebene Substanzen. Verschiedene Penicillium-Arten geben orange bis gelbe Pigmente ins Substrat ab und führen auf diese Weise zu deutlichen Farbänderungen (Scheffer und Lindgren, 1940). Doch stehen noch weitere Möglichkeiten, bei denen holzeigene phenolische Stoffe mitbeteiligt sein können, zur Diskussion. Im nachfolgenden Schema (Abb. 1) ist der Zusammenhang zwischen biotischen und abiotischen Ursachen dargestellt.

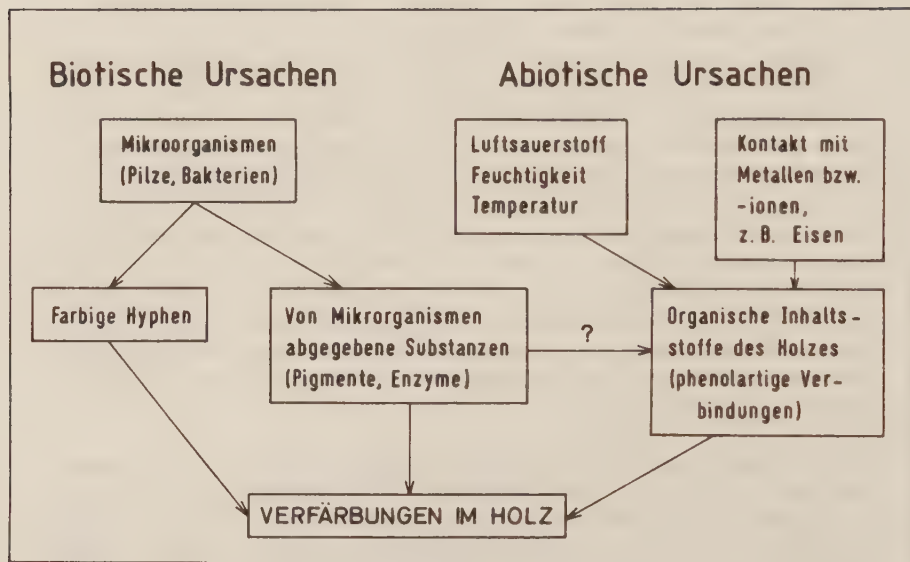


Abb. 1: Ursachen von Verfärbungen im Holz (Zimmermann, 1974).

Von großer wirtschaftlicher Bedeutung ist die Gefährdung des Holzes durch farbverändernde und/oder zerstörende pflanzliche Organismen, vor allem durch Pilze. Ein mit Pilz befallenes Holz ist in manchen Fällen sowohl durch die Veränderung technologischer Eigenschaften als auch durch die oft intensive Verfärbung von zahlreichen Verwendungen ausgeschlossen und daher in seinem Wert stark gemindert.

Bei Schäden, die durch Pilze hervorgerufen werden, muß zwischen holzverfärbenden und holzzersetzenden Arten unterschieden werden. Im Gegensatz zu den holzzersetzenden Pilzen, die die Zellwände der Holzzellen abbauen, führen die holzverfärbenden Pilze zu einem nachteilig verändertem Aussehen des Holzes. Die wichtigste Gruppe der holzverfärbenden Pilze sind die Bläuepilze. Unter "BLAUE" wird allgemein eine blaue bis grauschwarze Verfärbung des Holzes verstanden.

2. STAND DER FORSCHUNG

Zu den wirtschaftlich bedeutendsten verfärbenden Holzschädlingen zählen die Bläuepilze. Sie zerstören zwar das Holz in den meisten Fällen nicht (Rypáček, 1966), führen aber durch ihre sehr starke Verbreitung, ihr ungemein rasches Wachstum und den weit gefaßten Feuchtigkeitsbereich zu einer beträchtlichen Verfärbung des Holzes und einer damit verbundenen Wertminderung. Welches Ausmaß die Verfärbung des Holzes durch Bläuepilze annehmen kann, zeigt Abb.2. Sehr deutlich ist zu erkennen, daß bei der Kiefer nur der Splintbereich befallen wird, da nur dieser Bereich die für die Pilze verwertbaren Zellinhaltsstoffe aufweist.



Abb. 2: Verblaute Kiefernstammscheibe

Bläuepilze kommen bei verschiedenen Laub- und Nadelhölzern vor, besonders gefährdet sind in erster Linie die Kiefernarten. In den letzten Jahren bereitete der Absatz deutscher Kiefernschnittware zunehmend Schwierigkeiten. Als Ursache hierfür wurde ein verstärktes Auftreten der sogenannten "Innenbläue", eine besondere Erscheinungsform der Bläueschäden, angegeben (Anonymus, 1978; Hirsch,

1978). In Fichten - und Tannenholz sind die Verfärbungen meist oberflächlich und weniger stark ausgeprägt als beim Kiefernspilnholz. An Fichten aus immissionsgeschädigten Beständen wurde in den letzten Jahren ein vermehrtes Verblauen des Holzes beobachtet (Riederer von Paar, 1984; Schmidt, 1985; Saur et al., 1986).

Während noch Hartig (1900) lediglich eine Pilzart - *Ceratostoma piliferum* (Fries) - als Erreger der Bläue bezeichnete, haben spätere Untersuchungen zahlreiche weitere Arten ausfindig gemacht. Sieben Jahre später fand Münch (1907) fünf *Ceratocystis*-Arten sowie *Cladosporium* verantwortlich für die blaue bis schwärzliche Verfärbung des Kiefernholzes. 1927 stellten Lagerberg et al. in Schweden 16 verschiedene Bläueerreger fest. Melin und Nannfeld (1934) konnten weitere Erreger identifizieren. Die Forschungsarbeiten von Grosmann (1931, 1932), Robak (1932), Davidsson (1942, 1953), Neegard (1945), Mathiesen (1951), de Vries (1952), Goidanich (1953), Hunt (1956), um nur einige zu nennen, brachten zusätzliche Kenntnisse über die Pilze und ergänzten die Liste der Bläueerreger um weitere Arten. Bis heute wurden etwa 100 verschiedene Bläuepilzarten festgestellt (Grosser, 1985). Sie gehören teils zu den Schlauchpilzen (Ascomyceten), wobei wichtige Gattungen *Ceratocystis* (*Ophiostoma*) und *Cladosporium* sind, und teils zu den unvollständig bekannten Pilzen (*Fungi imperfecti*) (Holzschädlingstafel, 1954).

In der Natur handelt es sich beim verblauten Holz vielfach um eine Mischinfektion (Münch, 1907). Diese Infektionen können auf verschiedenste Art und Weise zustande kommen. Man unterscheidet dabei die Verbreitung durch Luftbewegungen, Insekten, Sägewerksmaschinen, Regenwasser und den Transport von bereits infiziertem Holz (Verall und de Vries, 1941). Am häufigsten werden Bläuepilze durch den Wind und gelegentlich durch Insekten verbreitet. Auch sind Vergesellschaftungen von Bläuepilzen mit mehreren Käferarten und mit bestimmten Borkenkäfern bekannt (Grosmann, 1931; Mathiesen, 1951).

Nach v. Pechmann und Wutz (1963) stellt ein zeitgerechter Einschlag (Winter), sowie das Belassen der Rinde bis kurz vor die Abfuhr einen Schutz vor dem Befall mit Bläuepilzen dar. Neben dem zeitgerechten Einschnitt und dem baldigen Abtransport sollte auf eine sorgfältige Lagerung des

Schnittholzes, die eine zügige Austrocknung ohne starke Rißbildung gewährleistet, geachtet werden (v. Aufseß, 1980). Wasserlagerung oder gänzliche Austrocknung, sowie Behandlung mit Insektiziden und Fungiziden (Butovitsch und Eidmann, 1962; Ammer, 1963; Björkman, 1963; Savory et al., 1965; v. Pechmann et al., 1967) führen auch zu dem gewünschten Erfolg. Vor allem in nordischen Ländern wird eine chemische Schutzbehandlung des Schnittholzes vorgenommen. Doch nicht immer kann davon ausgegangen werden, daß Holz das einmal einem Trocknungsprozeß unterzogen wurde bläuefrei bleibt. Die die "Anstrichbläue" verursachenden Pilze *Aureobasidium pullulans* und *Sclerophoma pityophila* befallen im Gegenteil getrocknetes Holz, das dann der Witterung ausgesetzt und mit einem Farb- oder Lackanstrich (z.B. Fenster) versehen wurde (Butin, 1965). Gegenmaßnahmen hierfür sind: 1. Glättung der Holzoberfläche, 2. Verwendung bläueschützender Grundiermittel und 3. fachgemäße bautechnische Verarbeitung des Holzes (Mombächer, 1988).

Im Holz ernähren sich die Bläuepilze nur von Inhaltsstoffen des Speichergewebes (Eiweiß des Protoplasmas, sowie Kohlenhydraten) (Holzschädlingstafel, 1954), deshalb findet sich ihr Myzel vielfach in dichten Knäueln im Quer- oder Längsparenchym, weniger stark gehäuft in den Tracheiden (v. Pechmann et al., 1964). Der Übergang von einer Zelle zur anderen erfolgt entweder durch Hoftüpfel, deren Torus mechanisch durchbrochen wird (z. B. *Ceratocystis coerulescens* (Münch) Bakshi, *Aureobasidium*, *Leptographium*, *Scopularia Lundbergii*, - *corsicana* (v. Beyma)), oder die Hyphen durchbrechen mit Hilfe kleiner Bohrhyphen die Zellwand (z.B. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, - *humicola* (Oudem), *Ceratocystis pilifera* (Fr.) C. Moreau, - *piceae* (Münch) Bakshi, - *penicillata* (Grosz.) C. Moreau, *Philophora fastigiata* (Lagerberg et Melin) Conant (Liese und Schmid, 1961)). Als Beispiel zeigt die Abb. 3 Hyphen von *Ceratocystis coerulescens* und *Alternaria alternata* im Kiefernholz. Im Innern von verblautem Holz zeigt sich bei mikroskopischer Betrachtung ein mehr oder weniger dichtes Geflecht von Pilzhypen. Die Hyphen von *Alternaria alternata* füllen stellenweise das Lumen von Tracheiden nahezu aus (Abb. 3 b).

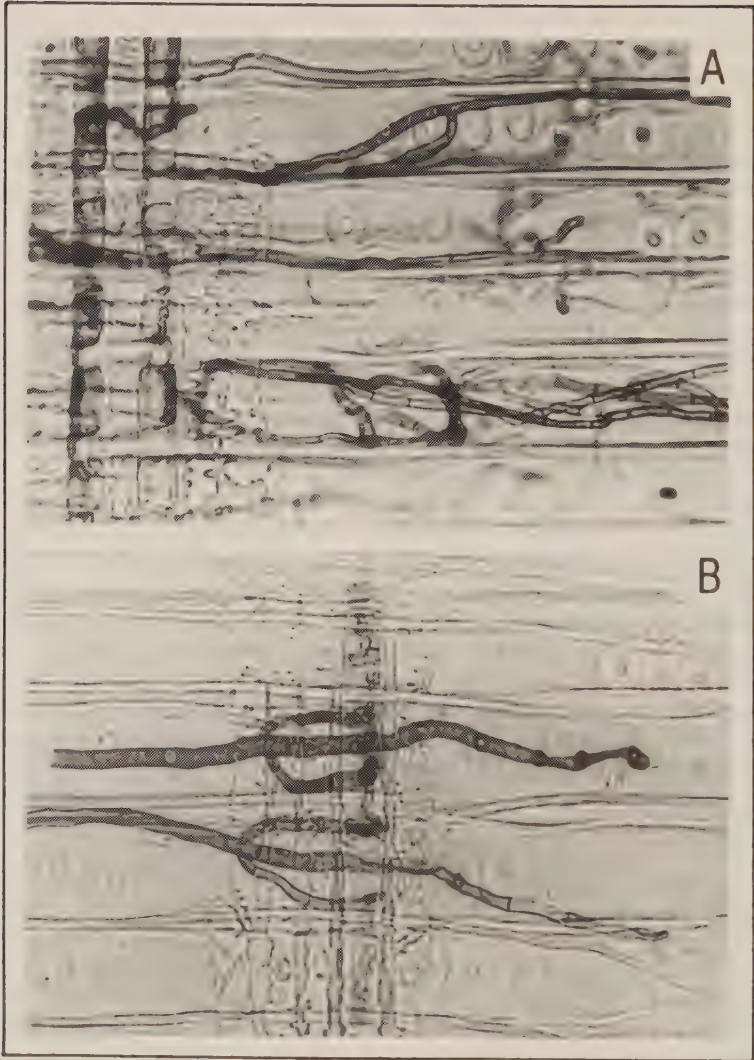


Abb.3: Hyphen von *C. coerulescens* (A) und *A. alternata* (B.).
Lichtmikroskopische Aufnahme, Verg. 350 x (E. Graessle).

Zur Auflösung der Zellwände fehlen den meisten Bläuepilzen die entsprechenden Enzyme; sie können demnach nicht als Cellulosezerstörer bezeichnet werden (Bavendamm, 1969). Dagegen gehören neben zahlreichen anderen Bläuepilzen *Alternaria alternata* und *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link zu den verblauenden Moderfäuleerregern (Bavendamm, 1969), wenn auch ihre Abbauintensität sehr gering ist (Courtois, 1963).

Seifert (1964) befaßte sich mit dem Abbau der Zellwandsubstanz durch Bläuepilze und stellte fest, daß *Aureobasidium pullulans* auf Kiefernholz nach 10 Wochen zu einem Gewichtsverlust von 1,7-2,1% führt. Der Gewichtsverlust ist hauptsächlich auf den Abbau von Pentosanen zurückzuführen, während sich der Cellulose- und Ligninanteil nur geringfügig verringerte. Die Enzyme Pectinase, Polygalacturonase Mannase und Cellulase sind hierfür verantwortlich (Rösch et al., 1969; Rösch und Liese, 1971; Berndt und Liese, 1971), während ligninspaltende Phenoloxidasen nur vereinzelt bei Bläuepilzen nachgewiesen werden konnten.

Da die Sporen von Bläuepilzen zu jeder Jahreszeit in der Luft vorhanden sind, außer bei strengem Frost, kann lagerndes Holz auch in der kalten Jahreszeit durch Bläuesporen infiziert werden. Günstige Entwicklungsbedingungen finden die Bläuepilze hauptsächlich in der wärmeren Jahreszeit in einem sehr weiten Holzfeuchtigkeitsbereich (25 bis größer 100%) (Knigge und Schulz, 1966). Seit den Untersuchungen von Münch (1907) ist bekannt, daß bereits eine leichte Verringerung der Splintfeuchtigkeit, meist reichen schon 10% (Lagerberg et al., 1927), gegenüber dem Waldfrischzustand dem Bläuepilz genügend Sauerstoff zum Wachstum im Holz liefert. Ein optimales Wachstum der Bläuepilze findet zwischen 20 und 28°C statt. Höhere Temperaturen, über 30°C, werden von den Pilzen im allgemeinen weniger gut vertragen als Kälte, die ihr Wachstum zwar einschränkt, sie selbst aber nicht schädigt (v. Pechmann et al., 1964).

Über den Einfluß von Bläuepilzen auf die mechanischen Eigenschaften von Kiefernholz gibt es ein umfangreiches Schrifttum. Einig sind sich die Autoren (Thunell, 1952; Badun, 1960; v. Pechmann et al., 1964 u. a.), daß die Druck- und Biegefestigkeit sowie der E-Modul kaum beeinflusst werden. Nach Findlay (1939) kann es nach 26 Wochen zu einer Festigkeitsabnahme bis zu 20% kommen. Eine Abnahme der

Bruchschlagarbeit (Schlagbiegefestigkeit) bis zu 30% konnte Thunell (1952) registrieren; Chapman und Scheffer (1940) vermerkten in natürlich infiziertem Kiefernholz eine um 15-30% verminderte Bruchschlagarbeit. An Hand der Bruchschlagarbeit kann die Pilzschädigung im Laborversuch am wirkungsvollsten dargestellt werden (v. Pechmann und Schaile, 1950). So konnte festgestellt werden, daß die stärkste Einwirkung auf die Festigkeit die Bläue- und Moderfäulepilze der Gattung *Alternaria* haben (v. Pechmann et al., 1964). Als Fazit ergibt sich, daß die statischen Festigkeitseigenschaften durch Bläuepilze nur unwesentlich, die dynamischen hingegen etwas deutlicher, aber nicht schwerwiegend, verringert werden.

Die Wertverluste bei verblautem Holz sind sowohl für die Forstwirtschaft als auch für die Holzwirtschaft sehr bedeutend; bei starker Verblauung des Kiefernspintanteils kann es zu einer Wertminderung um 1-2 Güteklassen kommen (v. Pechmann und Wutz, 1963). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Verfärbung näher zu erforschen.

Schon 1878 unternahm Hartig erste Untersuchungen über das Phänomen der Bläue. Er konnte nachweisen, daß die Bläue des Holzes durch dunkelgefärbte Pilzhypen verursacht wird. Münch (1907, 1908) betrachtete die blaue Farbe des Holzes als eine optische Erscheinung, die er mit dem Kontrast zwischen den braunen Hyphen und der hellen Farbe des Holzes erklärte und die analog zu der blauen Farbe des Tabakrauches oder wie die Blautöne wasserverdünnter Milch entstehen soll. Auch Bavendamm (1939) sowie Cartwright und Findlay (1958) waren dieser Ansicht. Bakshi (1951) beschrieb, daß der Pilz durch die Holzstrahlen in das Holz eindringt, daß die Hyphen anfangs farblos sind und erst später oder dann braun werden, wenn sie in leere Zellumina hineinwachsen. Die Verfärbung der Zellwände tritt erst nach einer bestimmten Zeit auf und wird auf das Nährstoffangebot zurückgeführt. Bestätigt wurde diese Ansicht von Laštůvka und Scháněl (1957). Ihr untersuchter Pilz *Ceratocystis pilifera* bildete bei ausreichender Stickstoffversorgung weder auf Agarnährböden noch im Holz Pigmente.

Der Schwerpunkt der bisherigen Arbeiten liegt in der Erforschung der Bläuepilze, der Ursachen und Verhinderung eines Befalls. Chemische Untersuchungen wurden zum einen im Hinblick auf die Enzyme der Bläuepilze (Berndt, 1967; Rösch et al., 1969; Rösch und Liese, 1971; Berndt und Liese, 1971) vorgenommen. Zum anderen wurde die Schleimschicht, welche die Hyphen der Pilze umgibt als aus α -Glucan ("Pullulan") und sauren Mucopolysacchariden bestehend charakterisiert (Bender et al., 1959; Schmid und Baldermann, 1967). Dem Phänomen der Blaufärbung wurde schon in früheren Arbeiten Aufmerksamkeit gewidmet. Basierend auf der Annahme, daß das Verblauen des Holzes auf dem Durchschiessern der gefärbten Hyphen durch das Holz beruht, ist es wichtig, nähere Erkenntnisse über das Pigment in den Pilzhypen zu erhalten. Bis jetzt wurde die chemische Struktur des Pigmentes von Bläuepilzen noch nicht ausreichend erforscht. Von Kitamura und Kondo (1958) wurde die Vermutung geäußert, daß es sich dabei um einen melaninähnlichen Stoff handeln könnte. Arbeiten von Ayer et al. (1985 a, b; 1986) befaßten sich mit der Erforschung von Stoffwechselprodukten von *Ceratocystis*-Arten. Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen wurde neben den bei Pilzen üblichen Metaboliten Ergosterol, Ergosterolperoxid und Fettsäuren 13 neue Stoffwechselprodukte gefunden. Einer dieser Metaboliten, das "Ceratolon" kann mit Eisen in vitro einen intensiv blaugefärbten Chelatkomplex bilden. Die Autoren äußerten die vorsichtige Vermutung, daß ein solcher Komplex zumindest teilweise an der Blaufärbung von Kiefernholz beteiligt sein könnte. Ausgehend von dieser Annahme, wurde der Metallgehalt von gesunden und mit Bläuepilzen befallenen Kiefern untersucht. Eine signifikante Differenz konnte nicht festgestellt werden (Ayer et al., 1985 b).

3. AUFGABENSTELLUNG

Da durch Lichtbrechungseffekte die "blaue Farbe" des Holzes zustande kommen soll, ist die Erforschung der Pigmente in den Hyphen Voraussetzung für die Klärung vieler offener Fragen. Für die Holzwirtschaft ist es wichtig zu wissen, ob bereits infiziertes Holz vor den wertmindernden blauen Verfärbungen bewahrt werden kann, da der Farbstoff erst ab einem gewissen Entwicklungsstadium auftritt und junge Hyphen noch farblos sind. Weiterhin kann, wenn das Pigment chemisch analysiert wurde, die Forschung in Richtung neuer Holzschutzwirkstoffe geleitet werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Struktur und die Eigenschaften des Farbstoffes an zwei Bläupilzen zu erforschen. Dazu müssen die zu untersuchenden Pilze zuerst auf ein geeignetes Flüssigmedium adaptiert werden. Parallel dazu ist es wichtig den Ort der Pigmenteinlagerung zu erforschen um anschließend gezielt mit der Extraktion beginnen zu können. Die extrahierten Pigmente müssen dann gereinigt, von Begleitstoffen sowie Verunreinigungen (Extraktionsmittel-, Fällungsmittel und Copräzipitaten usw.) befreit und getrocknet werden. Erst dann kann die eigentliche chemische Analyse des Farbstoffes beginnen.

Als Untersuchungsmaterial wurde ein zu der Gruppe der Ascomyceten gehörender Pilz, *Ceratocystis coerulescens* (Münch) Bakshi, (*Endoconidiophora coerulescens* (Münch), *Ophiostoma coerulescens* (Münch), *Endoconidiophora virescens* (Davids), *C. coerulescens*) sowie ein zu den verblauenden Moderfäuleerregern gehörender Fungi imperfecti *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, (*Alternaria tenuis* (Nees), *A. alternata*) gewählt. *C. coerulescens* entstammt einer Reinkultur aus dem Mycologischen Labor des Instituts für Holzforschung der Universität München (Frau Dr.H. von Aufsess), *A. alternata* wurde vom Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn, Niederlande, bezogen.

4. BESCHREIBUNG DER UNTERSUCHTEN PILZE

4.1. Taxonomie des Genus CERATOCYSTIS

4.1.1. Geschichte und Allgemeines

Der Name *Ceratocystis* kommt von *Ceratos* = Horn und *cyst* = Beutel, Tasche und wurde von Ellis und Halsted (in Halsted 1890) eingeführt. Der Autor gab in seiner Originalschrift aber keine genaue Charakterisierung des Pilzes an. Hunt (1956) beschrieb, daß 1892 *Ceratocystis* von Saccardo umbenannt wurde in *Shaeronaema*, und daß es durch Elliot (1923) zu einer weiteren Namensänderung in *Ceratostomella* kam. Melin und Nannfeldt (1934) nannten die Spezies *Ophiostoma* und Davidson (1935) *Endoconidiophora*. Erst 1950 führte Bakshi den Gattungsnamen *Ceratocystis* wieder ein.

Der Genus *Ceratocystis* umfaßt Ascomyceten mit erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung. Einige Spezies sind pathogen für Getreidepflanzen und für den Wald. Sie verursachen Baumkrankheiten und Verfärbungen des Holzes. Wieder andere sind dafür bekannt, daß erst sie es den Insekten ermöglichen, das Holz zu befallen (Hunt, 1956). Beim Ulmensterben ist nachgewiesen, daß der Pilz *Ceratocystis ulmi* (Buism.) Moreau die unmittelbare Ursache für das Absterben des Baumes darstellt. Oft führen Insektenangriffe und durch Pilze hervorgerufene Schädigungen zum Absterben des Baumes (Rumbold, 1931).

Für die Verbreitung der Gattung *Ceratocystis* ist es wichtig, daß der Pilz zu den schleimsporigen "Feuchtwetterpilzen" gehört und somit auch nach einigen Stunden Regen immer noch Sporen nachweisbar sind (Mathiesen-Käärik, 1955).

4.1.2. Morphologie von *Ceratocystis*

Hauptfruchtform

Perithechien, die Hauptfruchtformen, von *Ceratocystis* sind charakterisiert durch eine erweiterte Basis und einen schlanken Schnabel, verschwindend kleine Asci und hyaline Ascosporen (Sexualsporen der Ascomyceten). In der Abb.4 ist ein Perithecium von *C. coerulescens* dargestellt.

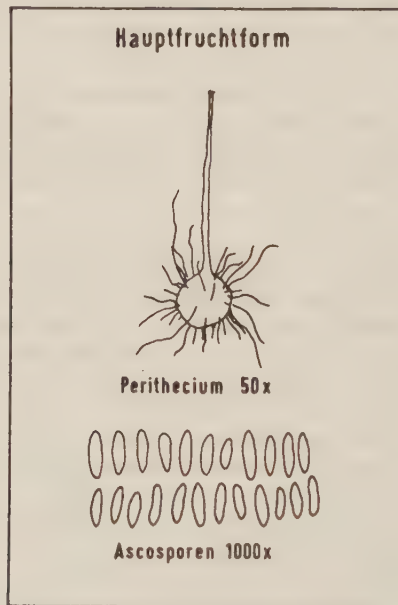


Abb. 4: Perithecium von *C. coerulescens* (v. Pechmann et al., 1964).

Die Perithechien werden einzeln oder in Büscheln, aber nicht in oder an einem Stroma (Traggeflecht) gebildet. Da die Asci verschwindend klein und ihre Wand sehr dünn ist, sind sie schwerlich in allen Stadien aufzufinden. Ascosporen sind eingehüllt in eine ölige, gelatinöse Masse im Innern der Perithechien. Hydrostatischer Druck entwickelt sich im Innern des Peritheciums und spritzt die gelatinöse Masse, welche die Ascosporen beinhaltet nach außen, wo sie

zunächst in Form eines größeren Tropfens hängen bleibt. Die Sporen sind einzellig und durchscheinend, bohnenförmig, elliptisch oder halbmondförmig, andere von einer gelatinösen Hülle mit zipfeligen Ecken umgeben. Weitere Variationen wie unregelmäßig viereckig, mond- oder hutförmig sind bekannt (v. Pechmann et al., 1964).

Nebenfruchtform

Für die Verbreitung der *Ceratocystis*-Arten haben ferner Nebenfruchtformen eine große Bedeutung. Auf Grund des Konidialstadiums wird die Spezies *Ceratocystis* in zwei Kategorien eingeteilt. Ungeschlechtliche Sporen, sogenannte Konidien, werden zum einen als Endokonidien gebildet (Bsp. *C. coerulescens*), während zur zweiten Kategorie Spezies, die exogen Konidien bilden (Myzelkonidien bei *C. minor* und Konidien vom *Graphium* und *Leptographium*typ), gehören. In beiden Fällen sind nur Ein-Zell-Konidien oder Endokonidien bekannt. Bei *C. coerulescens* sind die Konidiophoren aufrechte, unverzweigte, septierte Hyphen mit kräftiger, dunkelbrauner Membran, die endogen relativ große Konidien entwickeln, welche in Ketten ausgestoßen werden (Endokonidien). Abb. 5 und 6 zeigen Endokonidien von *C. coerulescens*. Die Mehrzahl der *Ceratocystis* Spezies gehört zur zweiten Gruppe.

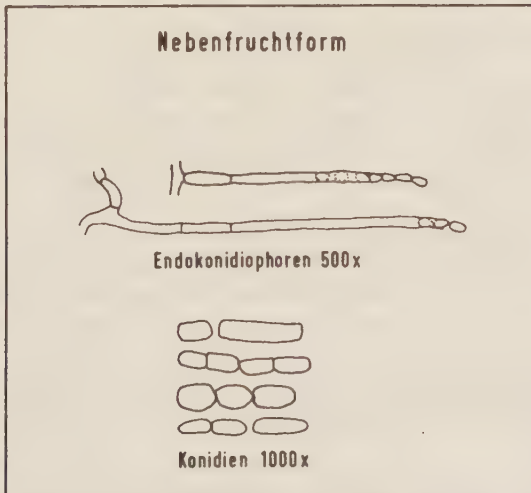


Abb. 5: Endokonidiophoren *C. coerulescens* (v. Pechmann et al., 1964).

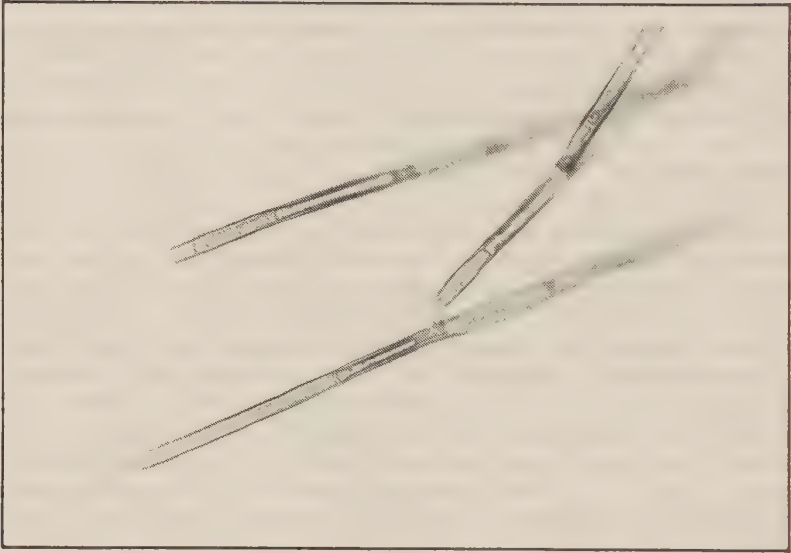


Abb. 6: Endokonidiophoren von *C. coerulescens*, 14 Tage altes Myzel. Lichtmikroskopische Aufnahme, Verg. 560 x.

4.1.3. Charakteristika der Kultur

Alle Spezies von *Ceratocystis* können auf geeignetem Nährmedium wachsen, manche verlieren dabei aber ihre charakteristischen Eigenschaften. Deshalb ist es wichtig die Kulturen dahingehend wiederholt zu überprüfen.

Die Farbe von jungen Kolonien ist immer hyalin oder weiß und bei einigen Spezies bleibt die Farbe auch im alternden Myzel unverändert. In den meisten Fällen aber wechselt die Myzelfarbe nach ein paar Tagen, und älteres Myzel ist dunkel gefärbt. Die Farbe des Myzels variiert von braun nach schwarz, von grau nach grün oder von oliv nach schwarz. Das Myzel von *C. coerulescens* ist dunkelgrün bis schwärzlich.

Die Wachstumsrate einer Spezies ist definiert als Durchmesser einer Kolonie in mm auf einem 2,5%igen Malzagar, bei 22°C nach 10 Tagen. Dabei sind bei der

Gattung *Ceratocystis* drei Wachstumsgeschwindigkeiten zu unterscheiden. 1. langsames Wachstum mit einem Rasen von 10 mm, 2. mittleres Wachstum mit 10-30 mm - hierzu zählt der untersuchte Pilz *C. coerulescens* - und 3. schnelles Wachstum mit einem Durchmesser von größer 30 mm. Während des Wachstums kommt es vor allem bei Endokonidienbildnern zu einem charakteristischen bananenartigem Geruch (Hunt, 1956). Von anderen Spezies wird ein säuerlicher, honigartiger oder aromatischer Geruch beschrieben.

4.2. Taxonomie des Genus *ALTERNARIA*

4.2.1. Geschichte und Allgemeines

Der Genus *Alternaria* wurde von Nees 1817 an Hand einer einzigen Spezies *Alternaria tenuis* (Nees) beschrieben. Fries nahm den Genus in seinem *Systema Mycologicum* 1832 nicht auf, sondern stellt ihn als ein Synonym von *Torula alternata* dar (Wiltshire, 1933).

Der Genus *Alternaria* gehört zu der Gruppe der Fungi imperfecti oder Deuteromycetes. *Alternaria* ist ein ubiquitärer Pilz und kommt sowohl im Holz, als auch auf Blättern und Nadeln vor, daneben findet man den Pilz an einer Unzahl von Kulturpflanzen insbesondere an Gartengewächsen und in Getreidefeldern (Neegard, 1945; Hyde und Williams, 1953). Bemerkenswert ist, daß die Bläuerreger der Gattung *Alternaria* wie auch solche der Gattung *Cladosporium* und *Philophora* auch den Moderfäulen zugeordnet werden (Courtois, 1963; Zycha, 1964). Wie bereits ausgeführt sind die verblauenden Moderfäulen tatsächlich in der Lage Cellulose anzugreifen (Bavendamm, 1969), verfügen aber nur über eine mäßige bzw. gehemmte Abbauintensität (Courtois, 1963).

Alternaria gehört zu den sogenannten "Trockenwetterpilzen", da die Sporen nach einigen Stunden Regen verschwinden, was für die Verbreitung von Bedeutung ist (Mathiessen-Käärik, 1955).

4.2.2. Morphologie von Alternaria

Hauptfruchtform

Das natürliche System der Pilze beruht auf dem Entwicklungsablauf und den Fortpflanzungsorganen. Von vielen Pilzen ist jedoch nur die Art und Weise ihrer vegetativen Vermehrung durch Konidien ("Nebenfruchtform") bekannt, wobei es unentschieden bleibt, ob die Hauptfruchtform noch nicht bekannt ist oder ob der Pilz die Fähigkeit, sie zu bilden verloren hat. Alle diese Pilze, etwa 20 000 >> Arten <<, hat man in die künstliche Gruppe der Fungi imperfecti oder Deuteromycetes zusammengefaßt.

Nebenfruchtform

Die Originalbeschreibung von Alternaria nach Nees (1817) ist wie folgt: Aufrecht, verstreute dunkle Hyphen mit separaten ovalen Gliedern, welche in verschiedenster Form verbunden sind. Abb. 7 zeigt die Nebenfruchtform von Alternaria.

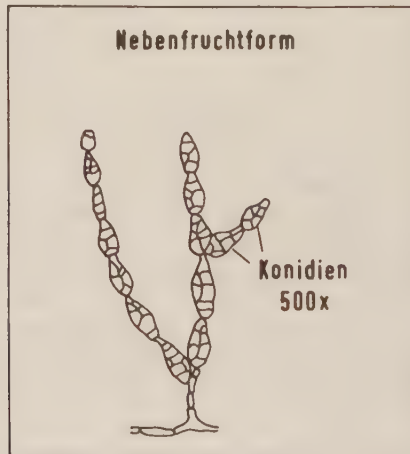


Abb.7: Nebenfruchtform von Alternaria (v. Pechmann et al., 1964).

Die artenreiche Gattung Alternaria hat braune Konidien, die durch Größe und Septierung auffallen. Sie werden bei A.

alternata an einfachen oder verzweigten Seitenarmen von Hyphen in Ketten gebildet, was das Hauptmerkmal der Gattung ist. Die Konidien sind dickwandig, sitzen am Myzel fest, dienen der Erhaltung und werden Chlamydosporen (Dauerform) genannt. Abb.8 und 9 zeigen Chlamydosporen von *A.alternata*.

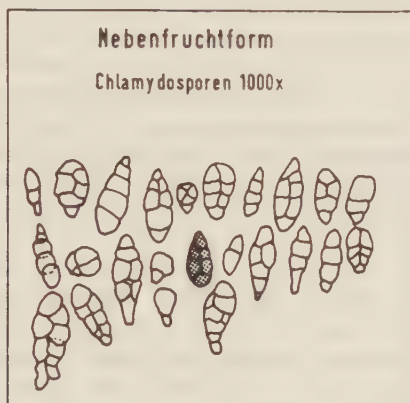


Abb. 8: Chlamydosporen von *A. alternata*. Die am häufigsten vorkommende Form ist grau gekennzeichnet.

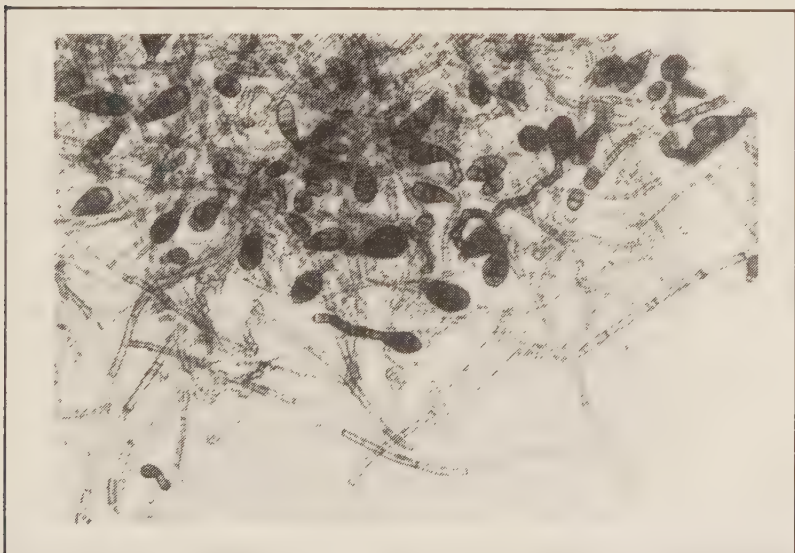


Abb. 9: Chlamydosporen von *A. alternata* in einem 14 Tage alten Myzel. Lichtmikroskopische Aufnahme, Verg. 560 x.

Da die Sporen am Myzel festsitzen, gehört *Alternaria* innerhalb der Gruppe der Deuteromycetes in die Form-Ordnung der Moniliales (v. Arx, 1967).

4.2.3. Charakteristika der Kultur

Alternaria stellt an ihr Nährmedium gewisse Bedingungen und entwickelt ihre charakteristischen Eigenschaften nicht immer. Auf Grund dieser Erkenntnis ist es unerlässlich, wie schon bei *C. coerulescens* erwähnt, die Kultur öfter zu überprüfen.

Die Farbe der Kolonien von *Alternaria* ist nicht einheitlich, im Zentrum werden oft weiße Büschel auf den Hyphen gebildet. Das Myzel selbst kann von gelblich bis dunkel olivgrün alle Farbnuancen haben. Der untersuchte Pilz *A. alternata* bildet ein erst farbloses und später dunkel grünolives Myzel aus.

Die Wachstumsrate ist nicht sehr groß und liegt bei 5,5 cm.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Kulturbedingungen

Das Pilzmyzel wurde in 500 ml Erlenmeyer Kolben mit je 200 ml Nährlösung bei $20 \pm 3^\circ\text{C}$ im Brutschrank gezüchtet. Für *C. coerulescens* war die Nährlösung nach Rösch et al. (1969) zusammengesetzt. Als Kohlenstoffquelle diente Glucose (25 g/l), als N-Quelle Asparagin (1 g/l). Das Nährmedium für *A. alternata* stellte sich aus KH_2PO_4 (2g/l), $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (0,2 g/l), KCl (0,1 g/l), Glucose (30 g/l) und NH_4NO_3 (1 g/l) zusammen oder 4% Malz-Medium (Maltzin, Diamalt).

5.2. Mikroskopische Untersuchungen

5.2.1. Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Beobachtung und Photographie erfolgte an einem Zeiss-Photomikroskop I. Untersucht wurde der Entwicklungsverlauf von *C. coerulescens* und *A. alternata*.

5.2.2. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie stand ein Gerät der Firma Zeiss (EM 10 C) zur Verfügung. Myzel verschiedener Altersstufen wurde mit 3% Glutaraldehyd / 2% Osmiumtetroxid fixiert, in Epon (Spurr) eingebettet und mit Bleicitrat bzw. Kaliumpermanganat nachkontrastiert.

5.2.3. Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Mit Hilfe eines Raster-Elektronenmikroskopes (Leitz AMR 1200 B) konnten anschauliche Bilder der Erscheinungsform von *C. coerulescens* und *A. alternata* sowie Erkenntnisse über ihre Morphologie gewonnen werden. Von gefriergetrocknetem Myzel wurden Präparate von einigen mm^2 Flächenabmessung abgeschnitten, auf Aluminiumträger ge-

klebt, anschließend mit Gold besputtert und im Raster-Elektronenmikroskop betrachtet.

5.3. Extraktionen

5.3.1. Extraktion der Pigmente

Zur Isolierung des Farbstoffes wurde Pilzmyzel (2-3 Wochen alt) geerntet, gut gewaschen und gefriergetrocknet. Zur Entfernung der Schleimschicht kam gefriergetrocknetes Myzel für ca. 2 Tage in Petrolether (Kp 40-60 °C). Anschließend wurde das Myzel abermals getrocknet, in der Kugelmühle pulverisiert und einer Alkaliextraktion unterworfen. Der erste Teil der Extraktion erfolgte unter Kochen am Rückfluß für 2-3 h in 0,5 n NaOH, dann für ca. 3-4 Tage bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Wechsel der NaOH. Nach dem Vereinen der so erhaltenen Extrakte erfolgt zum Entfernen der zellulären Bestandteile eine Zentrifugation bei 10 000 U/min 30 min. Der NaOH-Extrakt II wurde anschließend mit 1n HCl auf pH 1,5 angesäuert, wobei der Farbstoff präzipitierte. Eine erneute Zentrifugation (6 000 U/min 30 min) führte zu dem gewünschten Pigment. Das so erhaltene Pigment wurde wiederholt mit 0,1 n HCl gewaschen (bis das Waschwasser farblos war), gegen H₂O dest. dialysiert bis das Waschwasser chloridfrei war und gefriergetrocknet. Bei dem Pigment handelt es sich um ein dunkelbraun-schwarzes Pulver. In Abb. 10 ist der Ablauf der Extraktion zusammenfassend dargestellt.

5.3.2. Extraktion weiterer Bestandteile

Aus gefriergetrocknetem Myzel konnte nach Zerreiben mit Aceton/1n HCl (100+2) und vorgereinigtem Seesand im Mörser sowie nach anschließender Filtration (Schleicher & Schüll Nr. 589) ein gelber Extrakt gewonnen werden (Aceton-extrakt).

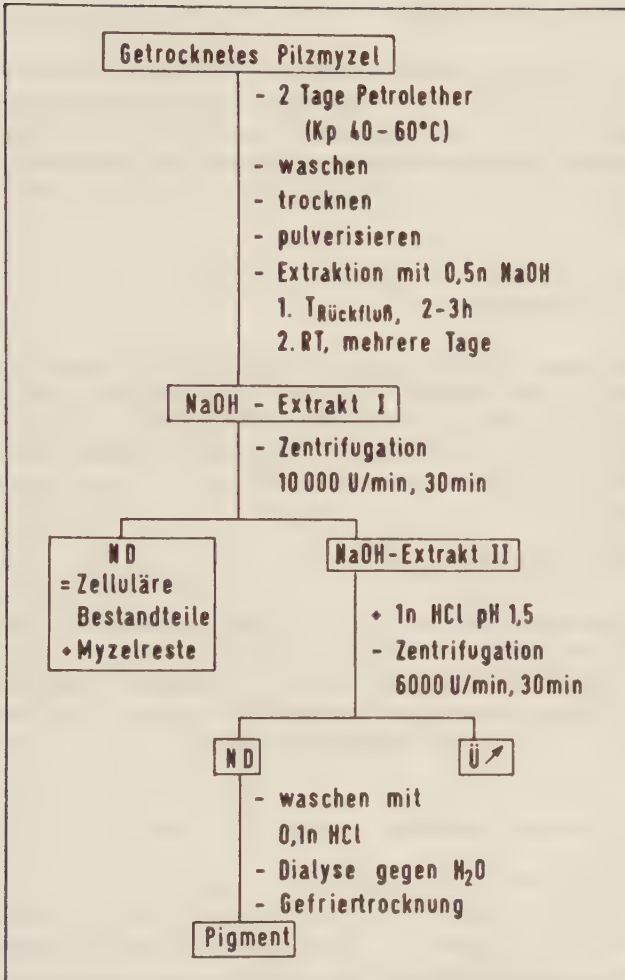


Abb.10: Extraktionschema

5.4. Spektroskopische Methoden

5.4.1. UV/VIS-Spektroskopie

Mit dem benutzten Spektrophotometer (PYE Unicam PU 8800 UV/VIS-Spektrophotometer, Philips) konnten Messungen im Wellenlängenbereich von 190-800 nm durchgeführt werden. Zur Ermittlung des Verhältnisses E_4/E_6 wurde die Extinktion bei 465 bzw. 665 nm in 0,05 n NaHCO_3 -Lösung gemessen (Schnitzer et al., 1973).

5.4.2. IR-Spektroskopie

Die Aufzeichnung quantitativer Infrarot-Spektren an KBr-Presslingen (1 mg Substanz/ 300 mg KBr) erfolgte mit einem Perkin-Elmer 281-Gerät bzw. mit Hilfe eines FT-IR-Gerätes (FTS-40, Digilab). Die FTIR-Spektren wurden nach 64 scans aufgenommen und basislinienkorrigiert.

5.4.3. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren (^1H -NMR und ^{13}C -NMR) wurden an einem 360 MHz-Gerät (Bruker) am Institut für Pharmazeutische Biologie, Lehrstuhl Prof. M.H. Zenk, aufgenommen. Die untersuchten Pigmente von *C. coerulescens* und *A. alternata* wurden in 0,1 n Deuteronatronlauge gelöst.

5.4.4. Massenspektroskopie

Die Erstellung der Massenspektren erfolgte an einem Varian MAT 311 A-Gerät, Anorganisch-chemisches Institut, Lehrstuhl für anorganische Chemie I der Technischen Universität München, PD Dr. Dr. habil. F.R. Kreißl.

5.5. Elementaranalyse

Die Bestimmung der Elemente C, H und N erfolgte in einem CHN-O-Rapid-Analysator (Heraeus).

5.6. Bestimmung der funktionellen Gruppen der Pigmente

5.6.1. Methoxylbestimmung

Mit Hilfe der Methode nach Vieböck und Schwappach (1930) konnte die Bestimmung der Methoxylgruppen durchgeführt werden. Um die Fehlergrenze so niedrig wie möglich zu halten, wurden vor und nach dem Wechsel der Iodwasserstoffsäure Blindversuche durchgeführt.

5.6.2. Simultanbestimmung der Carboxyl- und phenolischen OH-Gruppen

Auf der Methode von Pobiner (1983) basierend wurde 50 mg Pigment und 10 mg p-Hydroxybenzoesäure (interner Standard) in ca. 50 ml Dimethylformamid gelöst und mit 0,05 n Tetrabutylammoniumhydroxidlösung in einer Stickstoffatmosphäre potentiometrisch titriert (Digitalanalyzer Model 601, Multidosimat E 415, Metrom, mit angeschlossenen Schreiber). Die KCl-Lösung der Kalomelreferenzelektrode mußte hierfür durch eine 1 m Tetrabutylammoniumchloridlösung ersetzt werden.

Zur Berechnung mußte zuerst der Faktor der Titrierlösung (f) bestimmt werden. Über den Verbrauch an p-Hydroxybenzoesäure (V_{pHB}) = $M/138,13 \cdot n$ konnte mit Hilfe der folgenden Formel der COOH- bzw. phenolische OH-Gehalt (%) ermittelt werden.

$$\text{COOH (\%)} = \frac{(T_1 \cdot f - V_{\text{pHB}}) \cdot n \cdot 45 \cdot 100}{M}$$

$$\text{phenolische OH (\%)} = \frac{((T_2 - T_1) \cdot f - V_{\text{pHB}}) \cdot n \cdot 17 \cdot 100}{M}$$

T_1 = Titer der COOH-Gruppe (ml)

T_2 = Titer der phenolischen OH-Gruppe (ml)

n = Normalität der Titrierlösung

M = Einwaage der Probe (mg)

5.6.3. Bestimmung der Gesamt-OH-Gruppen

Zur Bestimmung der Gesamt-OH-Gruppen wurde die für Lignine beschriebene Methode (Browning, 1967) angewandt. 100 mg Substanz wurden mit einer Mischung aus Acetanhydrid und Pyridin (1:1) von ca. 2 g acetyliert. Die Reaktionszeit betrug, um auch eventuell vorhandene tertiäre Hydroxylgruppen bestimmen zu können, 3 Tage bei RT. Zu dieser Mischung wurden 50 ml H₂O dest. gegeben und für ca. 15 min gerührt. Anschließend gab man 25 ml Aceton sowie 25 ml H₂O dest. dazu und titrierte potentiometrisch mit 0,5 n NaOH (Phenolphthalein als Indikator). Eine Leerwertbestimmung erfolgte unter gleichen Bedingungen.

Der Hydroxylgehalt OH (%) berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$\text{OH (\%)} = \frac{((T_o / W_o) \cdot W - T) \cdot n \cdot 0,017 \cdot 100}{M}$$

T_o = Titer des Leerwertes (ml)

T = Titer der Probe (ml)

W_o = Gewicht des Acetylierungsgemisches des Leerwertes (g)

W = Gewicht des Acetylierungsgemisches der Probe (g)

n = Normalität der Titrierlösung

M = Einwaage der Probe (g)

5.6.4. Carbonylgruppenbestimmung

Die Analyse erfolgte nach der von Fritz et al. (1959) beschriebenen Methode. Ca. 100 mg Substanz wurden mit 20 ml 0,25 m 2-Dimethylaminoethanol und 25 ml 0,4 m Hydroxylammoniumchlorid versetzt, 30 min bei 70 °C gehalten und anschließend potentiometrisch mit 0,2 n Perchlorsäure titriert. Parallel dazu konnte der Umschlagpunkt an Hand des Farbwechsels von gelb nach blau (Indikatoren: Martiusgelb und Methylviolett) ermittelt werden. Eine Leerwertbestimmung wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Der Carbonylgehalt C=O (%) ergibt sich aus folgender Formel:

$$C=O (\%) = \frac{(T_o - T) \cdot n \cdot 28}{10 \cdot M}$$

T_o = Titer des Leerwertes (ml)
 T = Titer der Probe (ml)
 n = Normalität der Titrierlösung
 M = Einwaage der Probe (g)

5.6.5. Ermittlung der Chinongruppen

Durch Reduktion mit Sn^{2+} -saurem Medium wurde die Bestimmung der Chinongruppen durchgeführt. In Anlehnung an die Methode von Kukharensko und Yekaterinina (1967) wurden 100-200 mg Polymer mit 10 ml frisch zubereiteter 0,2 n $SnCl_2$ Lösung in Hydrolyseflaschen 4 h bei 120 °C gekocht. Nach Abkühlung auf RT, Filtration durch Blauband-Filter (Schleicher & Schüll, Nr. 589) und anschließendem Waschen mit H_2O dest. wurde das Filtrat auf 50 ml mit H_2O dest. aufgefüllt. 10 ml des Filtrates und 100 ml 1,5 n HCl sowie 1 ml 1% Stärkelösung wurden mit 0,1 n I_2 -Lösung titriert. Die Leerwertbestimmung erfolgte auf gleiche Weise.

Die Berechnung der Chinongruppen Ch (meq/g) ergibt sich aus der Formel:

$$Ch \text{ (meq/g)} = \frac{(T_o - T) \cdot n \cdot 5}{M}$$

T_o = Titer des Leerwertes (ml)
 T = Titer der Probe (ml)
 n = Normalität der Titrierlösung
 M = Einwaage der Probe (g)

5.7. Chemische Modifizierung und Spaltung der Polymere

5.7.1. Reduktion mit NaBH_4

Nach der von Kirk et al. (1975) beschriebenen Methode wurden die Proben einer Reduktion mit NaBH_4 unterworfen. Zu einer Mischung von Dioxan/dest. Wasser (1:1) kam das Probenmaterial und NaBH_4 im Verhältnis 5:1 dazu. Nach einer Stunde im Schüttelbad bei 18 °C erfolgte eine erneute Zugabe von NaBH_4 und weiteres Schütteln bei RT für 15 h. Nach Ansäuern mit 1 n HCl (pH 2-3) präzipitierten die reduzierten Pigmente.

5.7.2. Oxidation der Pigmente

Nach Piatelli et al. (1962) wurden in 4 ml 2n K_2CO_3 - Lösung 50 mg Pigment gelöst und mit 3% KMnO_4 oxidiert. Die Zugabe des Oxidationsmittels erfolgte langsam unter Rühren bis zu dem Punkt, an dem die Farbe für ca. 15 min bestehen blieb. Verbraucht wurden ca. 0,2 ml der KMnO_4 Lösung pro mg Einwaage. Anschließend erhitze man die Mischung in Hydrolyseflaschen 20 min bei 100 °C, filtrierte durch Blauband-Filter (Schleicher & Schüll, Nr. 589) ab und säuerte das Filtrat mit 2n HCl auf pH 4-5 an. Durch Zugabe von 20% igem CaCl_2 kann vorhandene Oxalsäure ausgefällt werden. Nach erneuter Filtration wurde mit konz. HCl stark angesäuert und mit tert. Butylmethylether wiederholt extrahiert. Nach Abtrennung des Lösungsmittels wurde der verbleibende Rest in 0,2 ml H_2O dest. gelöst, abfiltriert und gefriergetrocknet. Der Etherextrakt wurde über P_2O_5 getrocknet, anschließend in H_2O dest. aufgenommen und ebenfalls gefriergetrocknet.

5.7.3. Alkalifusion

Basierend auf der Methode von Piatelli et al. (1965) wurden 100 mg Pigment und eine Mischung aus 1 g NaOH, 1 g KOH und 50 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in einen Pt-Tiegel für 10 min bei 200 °C im Muffelofen erhitzt. Nach Abkühlung auf RT konnte diese Mischung in 2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (50 ml) wieder aufgelöst werden. Die Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 3-4 eingestellt und mit

tert. Butylmethylether wiederholt extrahiert. Die Etherextrakte wurden vereint, im Vakuum über P_2O_5 getrocknet, anschließend in H_2O dest. aufgenommen und gefriergetrocknet.

5.8. Untersuchung der Spaltprodukte und der Stoffe im Acetonextrakt

5.8.1. Chromatographische Methoden

5.8.1.1. Dünnschichtchromatographie

Die Extrakte nach der Alkalifusion bzw. Permanganatoxidation wurden dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt.

Die Trennung der Produkte nach der ALKALIFUSION erfolgte auf verschiedene Weise. Einmal wurden Kieselgelfertigplatten (KG 60 bzw. 60F-254, Merck) und ein Fließmittel bestehend aus Chloroform:Eisessig:Wasser (50:45:10) benutzt (Trennsystem I). Zum anderen wurde eine Trennung der Etherextrakte auf Cellulosefertigplatten (Cellulose bzw. Cellulose F, Merck) mit 0,005 n HCl (Trennsystem II) oder n-Butanol:Eisessig:Wasser (60:15:25) (Trennsystem III) erreicht. Die Identifizierung erfolgte zum einen durch Fluoreszenz im UV-Licht und zum anderen durch Besprühen mit Folin-Reagenz, 3%iger ethanolischer $FeCl_3$ -Lösung oder Ehrlich's Reagenz.

Die Etherextrakte nach der PERMANGANATOXIDATION wurden ebenfalls chromatographisch aufgetrennt. Hierzu verwendete man Cellulosefertigplatten (Cellulose bzw. Cellulose F, Merck) und ein Laufmittelsystem zusammengesetzt aus n-Butanol:Eisessig:Wasser (60:40:40). Die Detektion und Identifizierung erfolgte im UV-Licht bzw. durch Besprühen mit 3%iger ethanolischer $FeCl_3$ -Lösung oder Ehrlich's Reagenz.

5.8.1.2. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Mit Hilfe der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie wurden Acetonextrakte, gewonnen aus verschiedenen altem Myzel der beiden untersuchten Pilze, aufgetrennt. Benutzt wurden dazu Kieselgelfertigplatten mit und ohne Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60 ,bzw. 60F-254, Merck). Das Fließmittel der ersten Dimension war nach Leistner (1971) Chloroform-Ethylacetat-Ameisensäure (5:4:1), in der zweiten Dimension Dibutylether-Essigsäure (10:1).

5.8.1.3. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Gearbeitet wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer HPLC-Anlage der Firma Knauer, kombiniert mit einem Computer (Apple IIe) (Chromatochart, Heyden) und dem System der Reversed-Phase-Chromatographie. Die stationäre Phase war eine 100 RP-18-Lichrospher-Säule (Merck), die mobile Phase wurde variiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug meist 0,6 ml/ min. Weitere Einzelheiten der Methode sind im Ergebnisteil beschrieben.

5.9. Untersuchung weiterer Bestandteile des Polymers

5.9.1. Bestimmung des Proteinanteils

5.9.1.1. Hydrolyse und Aminosäuren-Analyse

Zum Nachweis der Aminosäuren im Polymer wurden 100 mg des Pigmentes mit 10 ml 6 n HCl unter N_2 24 h bei 105 °C hydrolysiert. Eine Hydrolyse bei 155 °C unter N_2 5 h in 6 n HCl führte zu dem gleichen Erfolg.

Die Aminosäuren-Analyse erfolgte am Institut für Hämatologie der GSF München, PD Dr. Dr. habil. M. Eulitz, unter Verwendung eines AS-Analysators LC 5000 (Biotronik).

5.9.1.2 Elektrophoretische Abtrennung der Proteinbande vom Polymer

Mit Hilfe einer Flachbettplatten-Elektrophorese konnte das Protein vom Polymer abgetrennt werden. Benutzt wurden hierfür Cellulose- oder Kieselgeldünnschichtplatten (Merck No. 5721, 5716) und ein Puffer bestehend aus: 50 ml Pyridin, 20 ml Eisessig mit H_2O dest. ad 1000 ml, mit Eisessig auf pH 5,2 eingestellt und 100 ml Aceton zugefügt. Die Trennung erfolgte bei 450 V, 17 mA während 3 h. Spannungsgerät: LKB 2197 und einer im Eigenbau erstellten Elektrophoreseapparatur. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde die DC-Platte getrocknet; die Detektion der Proteinbande erfolgte durch Besprühen mit 0,1% Ninhydrinlösung.

5.9.2. Bestimmung des Kohlenhydrat-Gehaltes

Nach verschiedenen Hydrolysebedingungen (schonende Hydrolyse, intensive Hydrolyse bei 100 °C und 107 °C mit Trifluoressigsäure (TFE)) (Fengel et al., 1976; Fengel und Wegener, 1979) erfolgte die Bestimmung in einem Zuckeranalysator (Biotronik LC 2000), indem die Zuckergemische nach Überführung in Boratkomplexe an einer Ionenaustauschersäule (DA-X4 20) in die einzelnen Komponenten getrennt und nach Farbreaktion (Orcin-Schwefelsäure bzw. Kupfer-Bichinchoninat) in einem Photometer quantitativ bestimmt werden.

Die Uronsäuren sollten ebenfalls aus dem Hydrolysat über die Boratkomplexe mit Hilfe eines Zuckeranalysators (ZA 5100, Biotronik) bestimmt werden. Es ist bekannt, daß uronsäurehaltige Polysaccharide gegenüber sauren Hydrolysen sehr widerstandsfähig sind und zum Teil drastische Bedingungen erfordern (Adams, 1965). Auf Grund dessen wurden neben der schonenden Hydrolyse mit TFE, die intensive Hydrolyse sowohl bei 100 °C als auch bei 107 °C mit TFE angewandt.

5.9.3. Bestimmung des Aschegehaltes und der Aschezusammensetzung

Der Aschegehalt wurde gravimetrisch nach vierstündigem Glühen bei 700 °C bestimmt.

Um die elementare Zusammensetzung der Asche zu ermitteln wurden vollständig, in Platintiegeln veraschte Proben auf Kohleteller geklebt, mit Antistatikspray behandelt und im REM (Leitz-AMR 1200 B), mit eingebautem Röntgenspektrometer (Kevex 2000), analysiert.

5.10. Synthese der Vergleichssubstanzen

Die Bezeichnung Catechol-Melanin und die Abkürzung Dopa-Melanin wurden aus dem internationalen, meist englischsprachigem Schrifttum übernommen.

Zur Synthese des Catechol-Melanins wurde nach der Methode von Piatelli et al. (1965) gearbeitet. Zu 0,3 g Catechol (Brenzcatechin, Sigma C 9510) wurden 200 ml Phosphatpuffer (pH 6,8) und 1 mg Tyrosinase (4300 U/mg, Sigma) gegeben und im Schüttelbad 6 h bei 37 °C gehalten. Mit 1 n HCl wurde das Catechol-Melanin bei einem pH 1,5 ausgefällt, abzentrifugiert (6000 U/min, 30 min), gegen H₂O dest. dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Dopa-Melanin wurde wie folgt hergestellt: Zu 0,3 g Dopa (D,L-3,4-Dihydroxyphenylalanin, Sigma D 9503) wurden 220 ml Phosphatpuffer (pH 6,8) und 1 mg Tyrosinase (4300 U/mg), Sigma) gegeben und im Schüttelbad bei 37 °C 6 h gehalten. Nach der Zugabe von 1 n HCl (pH 1,5) flockt Dopa-Melanin aus. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (6000 U/min, 30 min), gegen H₂O dest. dialysiert und gefriergetrocknet. Als weitere Vergleichssubstanz (Tyrosin-Melanin) diente ein handelsübliches Melanin, welches durch Persulfat-Oxidation aus L-Tyrosin hergestellt wird (Sigma M 8631).

5.11. Versuche an Holzstückchen

5.11.1. Künstliche Infizierung des Holzes mit *C. coerulescens* und *A. alternata*

Pilzfreie sterile Kiefernspalintholzstückchen (ca. 1x1x3 cm bzw. 4x2x8 cm) wurden mit einer steril entnommenen Aufschwemmung von *C. coerulescens* bzw. *A. alternata* Sporen besprüht. Zur Kontrolle besprühte man adäquate Kiefernspalintholzstückchen mit steriler Nährlösung oder Wasser. Der Versuch dauerte mehrere Wochen bei 20 ± 2 °C.

5.11.2. Imprägnierung von Kiefernspalintholzstückchen mit Melaninen

Pilzfreie Kiefernspalintholzstückchen (4x2x8 cm) wurden mit den entsprechenden Melaninen imprägniert. In einem Exsiccator wurden Holzstückchen in die entsprechenden Melanin-Suspensionen (Melanin-Wasser) gestellt. Der Exsiccator wurde evakuiert und gleichzeitig wurde die Melanin-Suspension in die Holzstückchen aufgesogen.

6. ERGEBNISSE

6.1. Mikroskopische Untersuchungen

Über lichtmikroskopische Untersuchungen von Bläuepilzen im Holz liegt ein umfangreiches Schrifttum vor (Liese und Schmidt, 1961; v. Pechmann, 1964). Im LICHTMIKROSKOP konnte der Wachstumsverlauf beider untersuchten Pilze verfolgt werden. Anfangs bildet sowohl *C. coerulescens* als auch *A. alternata* ein fädiges bis flockiges farbloses Myzel aus, das sich im weiteren Entwicklungsverlauf dunkel färbt. Die jungen Hyphen sind zuerst dünnwandig und nicht gefärbt (Abb.11) werden aber mit zunehmendem Alter breiter, abgeflachter und pigmentiert (Abb.12). An Hand von Entwicklungsverlaufs-Studien konnte gezeigt werden, daß die Pigmentierung mit der Bildung von Endokonidien bzw. Chlamydosporen einhergeht (Abb. 12, Pfeil).

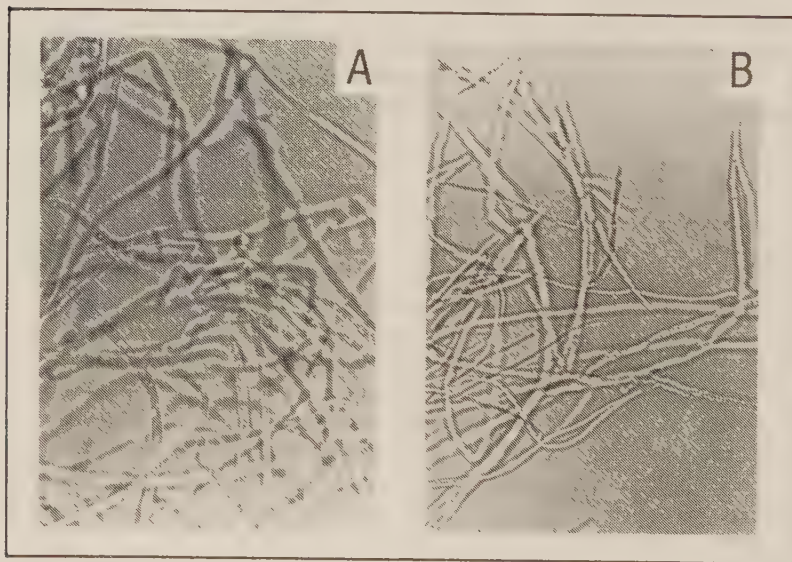


Abb. 11: Ein Tag altes Myzel von *C. coerulescens* (A) und *A. alternata* (B). Lichtmikroskopische Aufnahme, Verg.: 560 x.

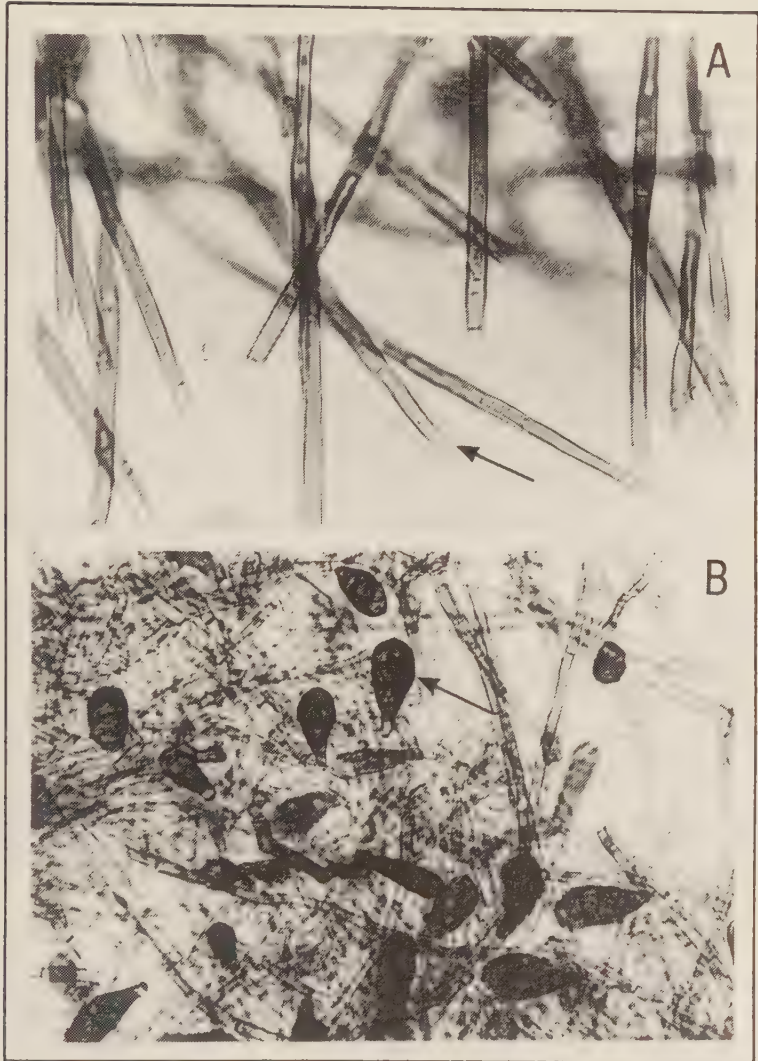


Abb. 12: Sieben Tage altes Myzel von *C. coerulescens* mit Endokonidien (A) und *A. alternata* mit Chlamydosporen (B) (Pfeil). Lichtmikroskopische Aufnahme, Verg.: 560 x.

Die Außenstruktur der Hyphen der untersuchten Bläuepilze konnte im RASTER-ELEKTRONENMIKROSKOP sehr gut untersucht werden. Als Erscheinungsbild des Myzels fällt die lockere Verflechtung der Hyphen auf. Bei *C. coerulescens* sind Endokonidien erkennbar, während Chlamydosporen von *A. alternata* schwerer identifizierbar sind (Abb. 13).

Es zeigte sich ein Unterschied zwischen jungen und älteren Hyphen. Ältere Hyphen mit dickwandigen, starren Zellwänden behielten auch im wasserfreien Zustand und im Hochvakuum ihre runde Querschnittsform, während junge und noch nicht ausdifferenzierte Zellen des Myzels kollabierten. Wie schon die lichtmikroskopischen Untersuchungen gezeigt haben, kam es im Laufe der Entwicklung der Pilze zu einer Umfangszunahme der Hyphen. Der Hyphenquerschnitt von jungen Hyphen beträgt sowohl bei *C. coerulescens* als auch bei *A. alternata* ca. 1,8 μm . Mit zunehmendem Alter werden die Hyphen bei beiden untersuchten Pilzen stärker und der Hyphenquerschnitt liegt bei ungefähr 3 μm .

Ein weiteres Kriterium bildet die Oberflächenstruktur, die bei jungen Hyphen sowohl von *C.coerulescens* als auch von *A. alternata* glatt ist. Im Laufe der Entwicklung treten bei beiden Pilzen deutlich warzige Auswüchse auf. Die Oberflächenstruktur von älteren Hyphen zeigt sich viel rauher und oft mit warzigen Auswüchsen besetzt (Abb. 14, 15). Eine rauhe, borkige Oberfläche, die zum Teil auch als warzig bezeichnet wurde, beschrieben Schmid und Liese 1965. Diese Oberflächenunebenheiten wurden als Abdrücke von Protoplasmabestandteilen oder vom Holzuntergrund gedeutet. Letzteres kann bei den vorliegenden Untersuchungen ausgeschlossen werden, da die Pilze in Flüssigkultur gezogen wurden.

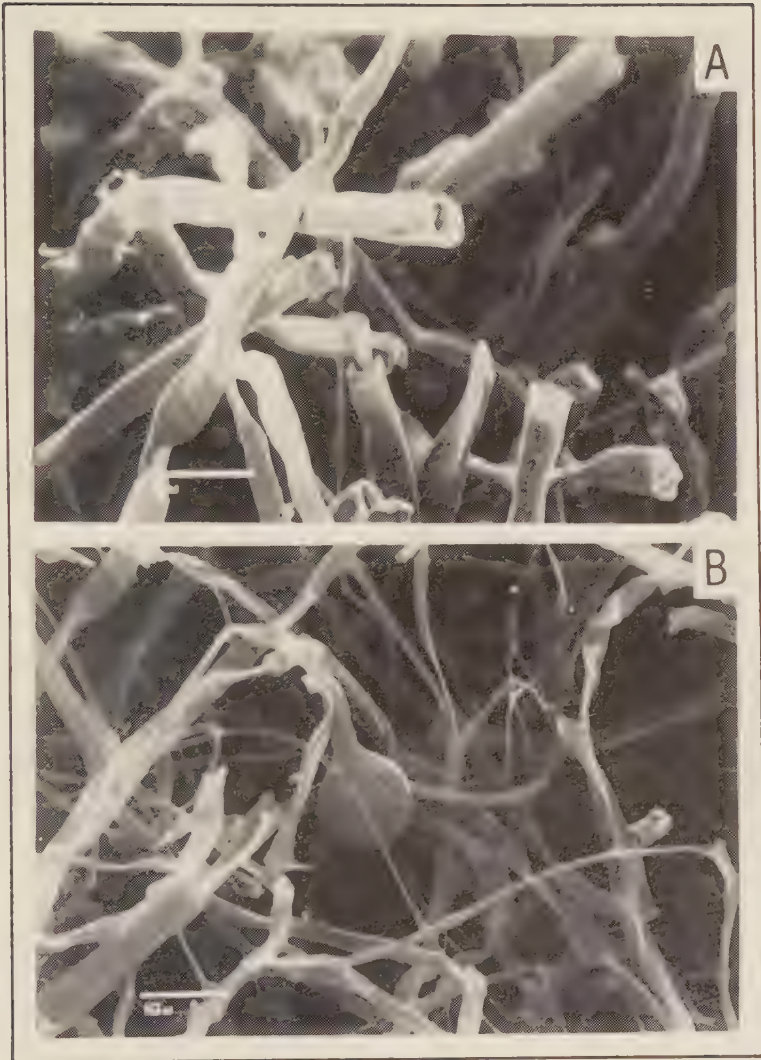


Abb. 13: Hyphen von *C. coerulescens* (A) und *A. alternata* (B). REM-Aufnahme.

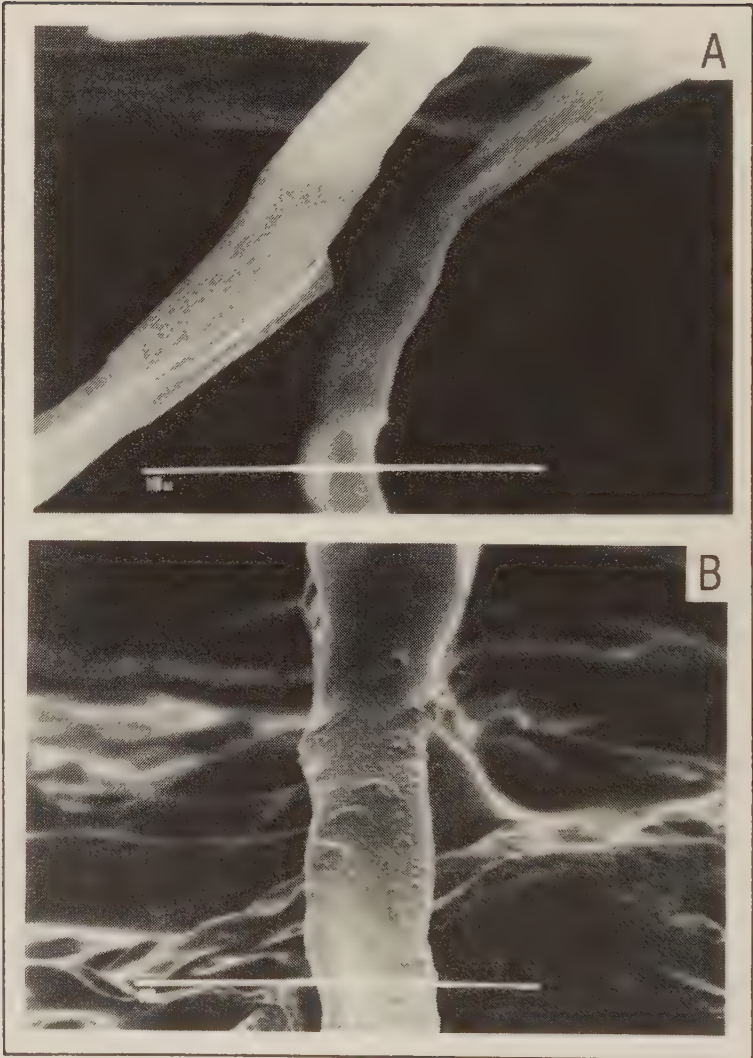


Abb. 14: Junge Hyphen mit glatter Oberfläche (A) und ältere Hyphe mit warzigen Auswüchsen (B) von *C. coerulescens*. REM-Aufnahme.

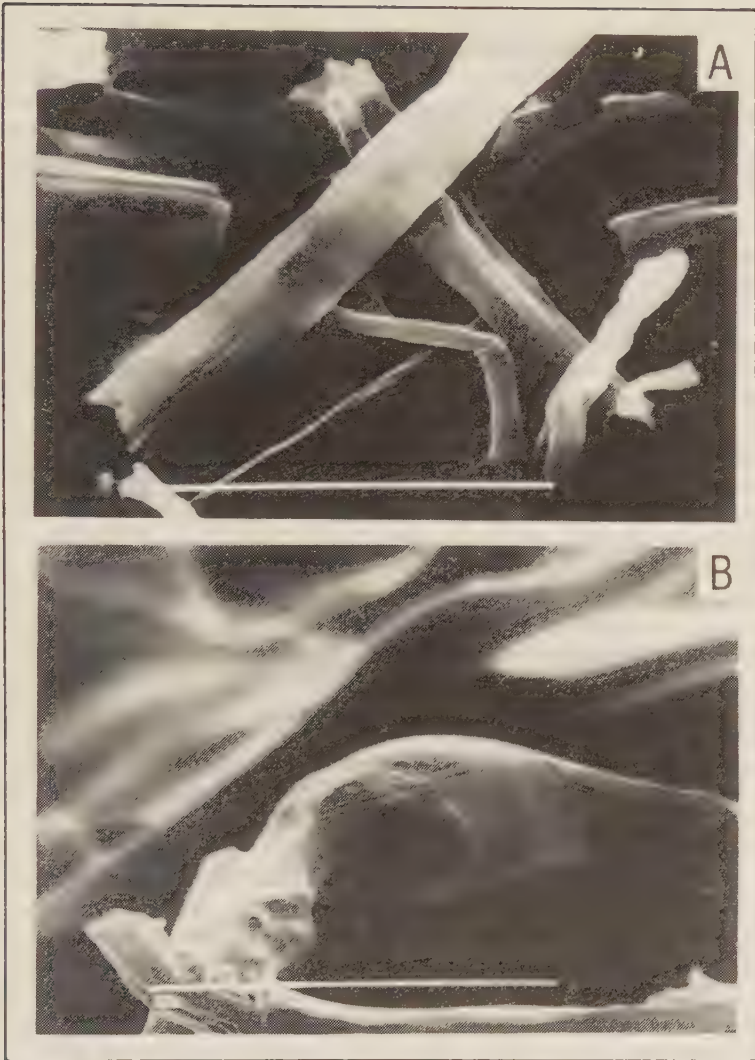


Abb. 15: Glatte Oberflächenstruktur bei jungen Hyphen (A) und ältere Hyphe mit warzigen Auswüchsen (B) von *A. alternata*. REM-Aufnahme.

Aus der Literatur bekannte elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden vorwiegend in Hinsicht auf das Wachstum der Hyphe durch die Zellwände und Tüpfel des Holzes (Liese und Schmid, 1961; 1964) sowie auf die Außenstruktur der Hyphen einiger Bläuepilze (Schmid und Liese, 1965) vorgenommen. Aus diesen Veröffentlichungen ist bekannt, daß die Oberfläche der Hyphen glatt ist oder eine granulierte bisweilen auch fibrilläre Strukturierung zeigt. Ferner konnte eine Schleimschicht, die entweder strukturlos, granulär oder fibrillär ausgebildet, ist nachgewiesen werden.

Untersuchungen am TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOP sollten zur Lokalisation des Pigmentes herangezogen werden. Myzel verschiedener Altersstufen zeigt elektronenoptisch einen mehrschichtigen Zellwandaufbau. Die ein Tag alten Hyphen von *C. coerulescens* und *A. alternata* ließen in der elektronenmikroskopischen Betrachtung einen identischen dreischichtigen Zellwandaufbau erkennen. An die äußere aus granulären Gebilden zusammengesetzte Schicht schließt sich nach innen eine weitere granuläre Zone an, gefolgt von einer dünnen hochkontrastierten Zone (Plasmalemma). Im Durchschnitt ist die Zellwand von *C. coerulescens* 200 nm, die von *A. alternata* 250 nm dick. Die von Parameswaran und Ruetze (1984) an *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt beschriebene transparente Zone zwischen der äußeren und mittleren Schicht konnte nicht gefunden werden. Die ganze Zellwand einer ein Tag alten Hyphe war sowohl bei *C. coerulescens* als auch bei *A. alternata* nicht stark kontrastiert, die mittlere Schicht war elektronendurchlässig (Abb. 16 und 17).

Mit zunehmendem Alter wurden die Hyphen von *C. coerulescens* als auch von *A. alternata* pigmentiert. Elektronenmikroskopisch konnte im Cytoplasma von sechs Tage altem Myzel eine Zunahme von elektronendichten granulären Strukturen festgestellt werden. Diese granulären Strukturen werden teils in allen Zellwandschichten, hauptsächlich aber in der äußersten Schicht angetroffen (Abb. 18 und 19). Die äußere Zellwandschicht stellt sich bei *C. coerulescens* als aus Granulae zusammengesetzte hochkontrastierte, durchschnittlich 130 nm dicke Zone dar, während bei *A. alternata* diese hochkontrastierte Zone im Mittel nur 50 nm beträgt.

Inwieweit diese hochkontrastierten Cytoplasma- und Zellwandstrukturen dem gesuchten Pigment entsprechen konnte mit Hilfe von "Albino-Mutanten" abgeklärt werden. Im Laufe

der Versuche kam es immer wieder vor, daß ganze Anzuchtsreihen von *C. coerulescens* als auch von *A. alternata*, auch nach längeren Wachstumszeiten, ungefärbt blieben. Dieses farblose Myzel wurde ebenfalls elektronenoptisch untersucht. An Hand dieser Präparate (Abb. 20) zeigt sich ein mehrschichtiger Zellwandaufbau, der ähnlich dem von jungem Myzel ist. Ein detaillierter Vergleich ergibt, daß sowohl bei den "Albino-Mutanten" von *C. coerulescens* als auch von *A. alternata* die äußere, aus granulären Gebilden zusammengesetzte Schicht fehlt, statt dessen bildet nach Außen eine hochkontrastierte glatte Zone den Abschluß.

Die Zellwand der "Albino-Mutanten" ist wesentlich dünner als bei den entsprechenden unpigmentierten jungen Hyphen. Bei *C. coerulescens* beträgt sie 100 nm, bei *A. alternata* 150 nm und ist damit fast um die Hälfte dünner. Versuche dieser Art erlauben die Schlußfolgerung, daß sowohl granuläre Strukturen im Cytoplasma als auch in der Zellwand im Zusammenhang mit dem gesuchten Pigment zu diskutieren sind.

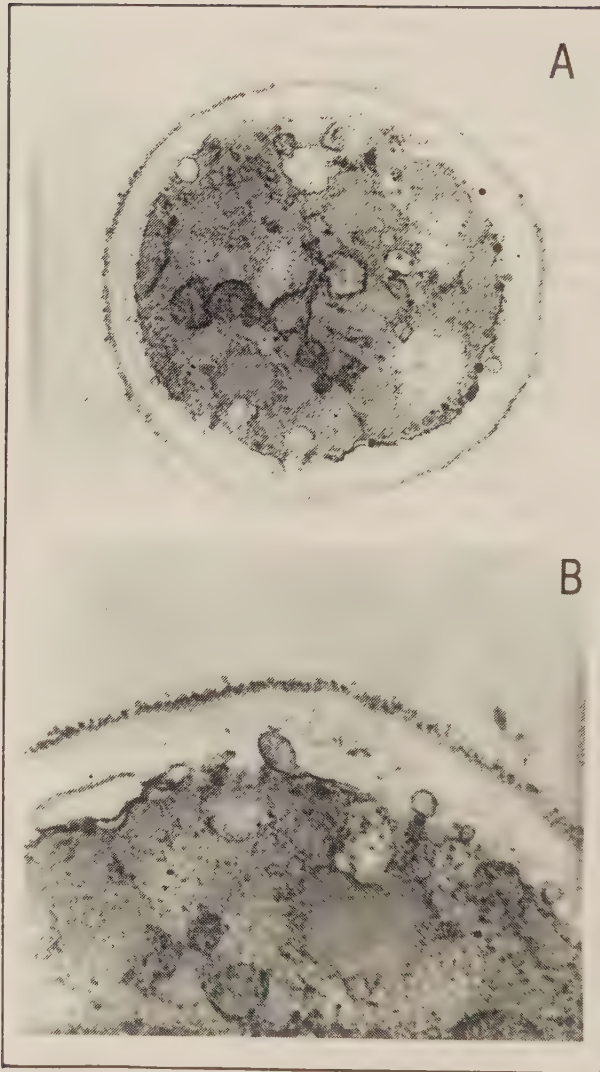


Abb. 16: Ein Tag alte Hyphe von *C. coerulescens*. Es sind keine Ablagerungen von Farbstoff in der Zellwand zu erkennen. TEM-Aufnahme (M. Wenzkowski).

Fixierung: Glutaraldehyd/Osmiumtetroxid, Kontrastierung: Bleicitrat.

A: Übersichtsaufnahme, Verg.: 25 000 x.

B: Detailaufnahme, Verg.: 50 000 x.

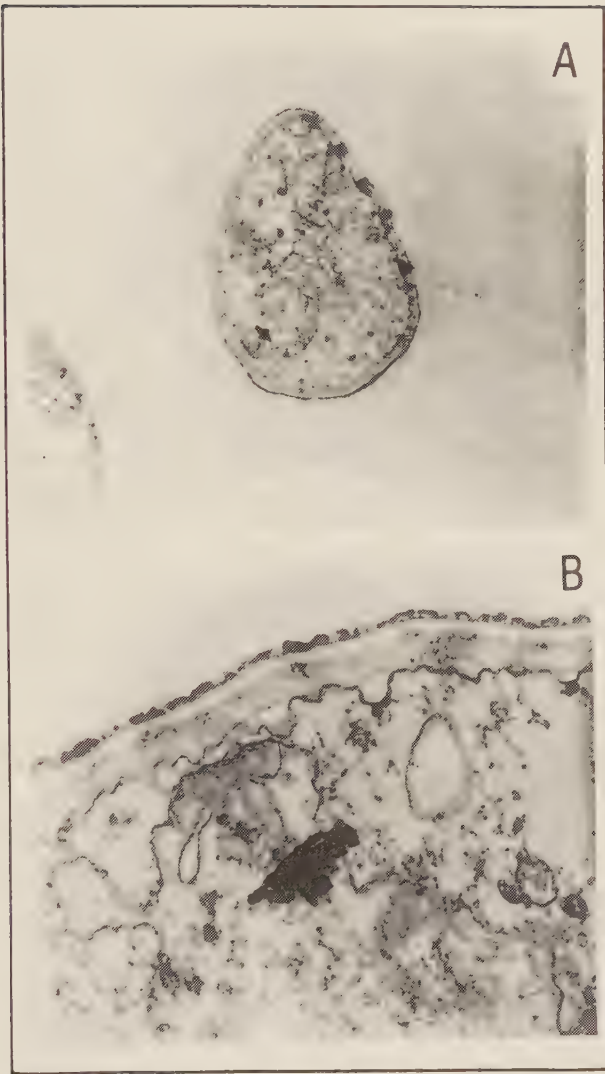


Abb. 17: Zellwand ohne Farbstoffeinlagerungen einer einen Tag alten Hyphe von *A. alternata*. TEM-Aufnahme (M. Wenzkowski).

Fixierung: Glutaraldehyd/Osmiumtetroxid, Kontrastierung: Bleicitrat.

A: Übersichtsaufnahme, Verg.: 20 000 x.

B: Detailaufnahme, Verg.: 40 000 x.

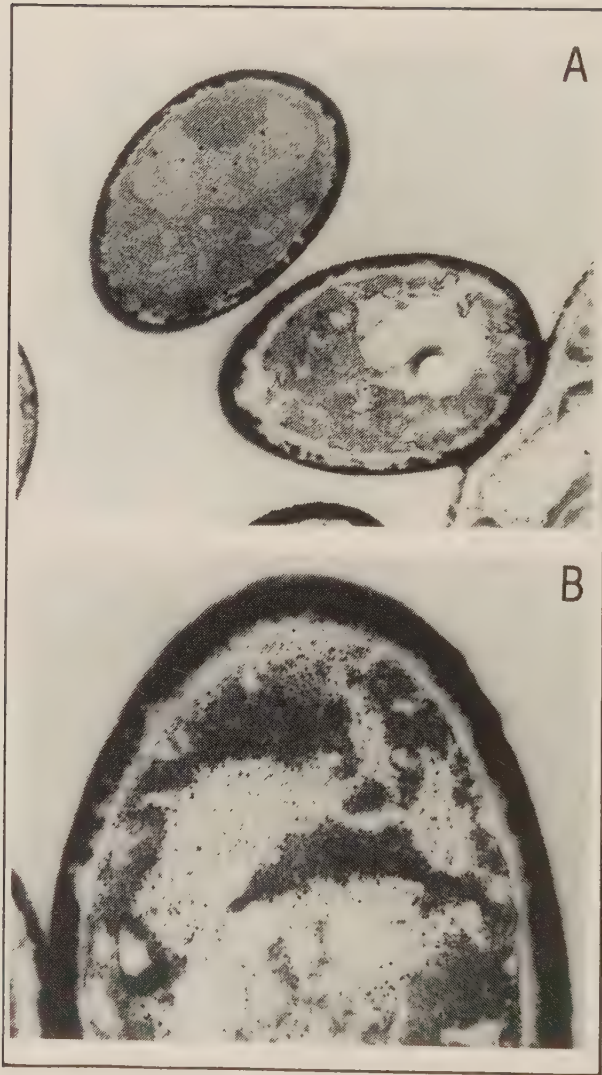


Abb. 18: *C. coerulescens*, sechs Tage alte Hyphe mit granulären Strukturen in der Zellwand und im Cytoplasma. TEM-Aufnahme (M. Wenzkowski).

Fixierung: Glutaraldehyd/Osmiumtetroxid, Kontrastierung: Bleicitrat.

A: Übersichtsaufnahme, Verg.: 28 000 x.

B: Detailaufnahme, Verg.: 45 000 x.



Abb. 19: Starke hochkontrastierte Strukturen in der Zellwand und im Cytoplasma einer mehrere Tage alten Hyphe von *A. alternata*. TEM-Aufnahme (M. Wenzkowski).

Fixierung: Glutaraldehyd/Osmiumtetroxid. Kontrastierung: Bleicitrat.

A: Übersichtsaufnahme, Verg.: 20 000 x.

B: Detailaufnahme, Verg.: 40 000 x.

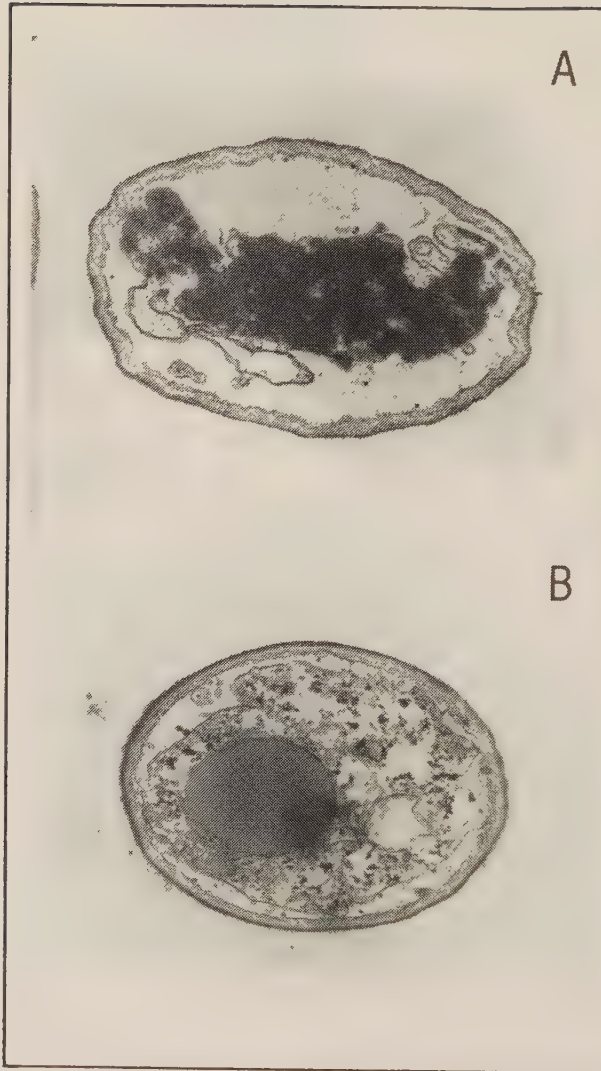


Abb. 20: "Albino-Mutanten" von *C. coerulescens* (A) und *A. alternata* (B). TEM-Aufnahme (M. Wenzkowski).
Fixierung : Glutaraldehyd/Osmiumtetroxid. Kontrastierung:
Bleicitrat. Verg.: 40 000 x (A) und 20 000 x (B).

6.2. Chemisch-analytische Untersuchungen

Bei dem Pigment von *C. coerulescens* und *A. alternata* handelt es sich um ein schwarz-braunes Pulver. Lösungsversuche ergeben eine Unlöslichkeit in Wasser und in organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Chloroform und Ethanol. Gut löslich dagegen sind die Präzipitate im alkalischen Milieu (KOH, NaOH). Weitere orientierende Charakterisierungsversuche ergeben eine Entfärbung der dunklen Pigmente durch H_2O_2 . Die Reaktion mit $FeCl_3$ auf Polyphenole ist sowohl bei *C. coerulescens* als auch bei *A. alternata* positiv. Die Dialyse durch eine Cellophan-Membran ist nicht möglich und spricht für ein hohes Molekulargewicht.

Auf Grund dieser Versuche ergab sich die Vermutung, daß die aus den Pilzen extrahierten Pigmente in die große Gruppe der Melanine einzuordnen sind. Melanine sind weit verbreitet und kommen sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich vor. Sie sind keine einheitlichen, im Sinne der klassischen Chemie definierten Verbindungen. Bei ihnen handelt es sich per definitionem (Nicolaus, 1968) um schwarze oder dunkelfarbige Substanzen, die unlöslich in den meisten Lösungsmitteln sind, die durch H_2O_2 entfärbt werden und die fähig sind $AgNO_3$ zu reduzieren. In Abb. 21 ist ein Diagnostik-Test für Melanine dargestellt. Alle in diesem Diagnostik-Test angeführten Versuche ergeben eine für Melanine typische, positive Reaktion.

Innerhalb der Gruppe der Melanine gibt es neben Allomelaninen, die normalerweise schwarz gefärbt sind, vorwiegend im Pflanzenreich vorkommen und durch Oxidation von Diphenolen wie z.B. Catechol gebildet werden, noch Eumelanine. Letztere sind ebenfalls schwarz gefärbte Polymere, werden meist im Tierreich gefunden und entstehen durch Oxidation von Tyrosin (Swan, 1974). Ob die Pigmente von *C. coerulescens* und *A. alternata* tatsächlich in die Gruppe der Melanine gehören, und ob eventuell eine weitere Klassifizierung in Allo- oder Eumelanine möglich ist, sollte durch die nachfolgenden chemisch-analytischen Experimente abgeklärt werden. Als Vergleichssubstanzen für die eigenen Untersuchungen dienten Tyrosin-, Dopa- (Eumelanine) und Catechol-Melanin (Allomelanin) (s. 5.10.).

DIAGNOSTIK - TEST: MELANINE		
	<i>C. coerulescens</i>	<i>A. alternata</i>
Löslichkeit in Wasser	-	-
Löslichkeit in organ. Lösungsmitteln	bedingt	bedingt
Löslichkeit in Alkali	+	+
Reaktion mit Oxidationsmitteln	Entfärbung	Entfärbung
Nachweis von Polyphenolen (FeCl_3)	+	+
Dialyse durch Cellophanmembran	-V _e	-V _e
Farbe	schwarz - braun	schwarz-braun

Abb. 21: Diagnostik-Test für Melanine (nach Ellis und Griffiths, 1974).

6.2.1. Spektroskopie

Bei der Analyse und Konstitutionsermittlung von Naturstoffen nehmen spektroskopische Verfahren eine besonders wichtige Stellung ein. Mit Hilfe der Spektroskopie können oft Hinweise auf Strukturmerkmale und deren spezifische Eigenschaften erhalten werden, die dann durch andere Methoden verifiziert und zusätzlich bestätigt werden können.

6.2.1.1. UV/VIS-Spektroskopie (190-800 nm)

Alle organischen Verbindungen absorbieren ultraviolette oder sichtbares Licht. Mit den heute verfügbaren Spektrophotometern ist es möglich, Spektren bei richtiger Wahl des Lösungsmittels bis 190 nm aufzunehmen.

Die in Abb.22 dargestellten Spektren wurden in 0,05 n NaOH aufgenommen, die Konzentration betrug 1 mg Substanz / 10 ml 0,05 n NaOH. Die fünf untersuchten Substanzen zeigen einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf mit einem Extinktionsmaximum im Bereich um 216 nm und einer Schulter im Bereich von 260-280 nm. Bei *C. coerulescens* und *A. alternata* ist der

Kurvenverlauf nahezu identisch, das Maximum liegt bei 216 nm, die Schulter bei 282,5 nm. Bei den Vergleichssubstanzen stimmen die Spektren von Tyrosin- und Dopa-Melanin (216,7 und 262,9 nm) weitgehend überein, während beim Catechol-Melanin die Schulter ebenfalls bei 262,9 nm, das Extinktionsmaximum aber bei 217,4 nm liegt.

Aus den Extinktionskurven sind jedoch wenig konstitutive Merkmale herleitbar. Die leichte Schulter im Bereich von 260 - 280 nm kann ihre Ursache in aromatischen und/oder chinoiden Strukturelementen haben.

Aus der Literatur (Filip et al., 1976; Schnitzer, 1971; Ziechmann, 1980 u.a.) ist bekannt, daß melaninartige Stoffe, Melanine und Huminstoffe im Bereich von 190-800 nm wenig charakteristische Spektren aufweisen. Der mehr oder minder gleichförmige Abfall der Absorption mit zunehmender Wellenlänge ist zwar ein typisches, wenn auch wenig informatives Kennzeichen dieser Stoffgruppe.

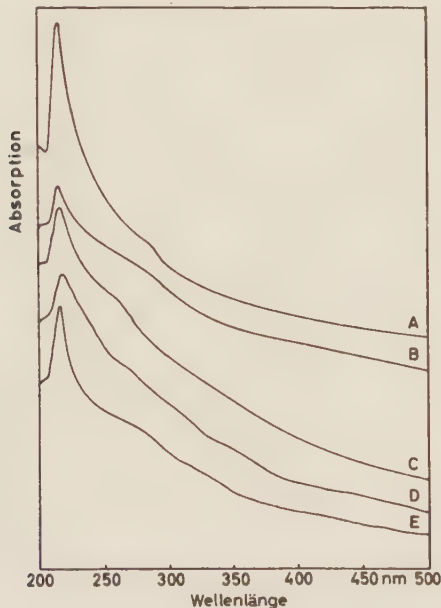


Abb. 22: Vergleichende Darstellung der UV-Spektren von A: *C. coerulescens*, B: *A. alternata*, C: Tyrosin-Melanin, D: Dopa-Melanin, E: Catechol-Melanin.

6.2.1.2. Infrarot-Spektroskopie ($4000-450\text{ cm}^{-1}$)

Molekülschwingungen und -rotationen werden durch Absorption von Strahlung im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums angeregt. Absorptionsbanden in definierten Bereichen des IR-Spektrums sind funktionellen Gruppen von organischen Molekülen zuzuordnen. Da diese Molekülschwingungen weitgehend auf die funktionelle Gruppe lokalisiert sind, können funktionelle Gruppen direkt an Hand ihrer Absorptionsbanden identifiziert und zur Strukturaufklärung herangezogen werden.

Bei Melaninen und melanin-huminsäureartigen Stoffen liegen allerdings verhältnismässig wenig funktionelle Gruppen vor. Die vorhandenen Banden sind zudem in einem hohen Maße aufgeweitet und oft durch eine beachtliche Untergrundabsorption überdeckt. Nur in wenigen Bereichen sind deutliche Banden wahrnehmbar, die zur Identifizierung der Stoffe beitragen können.

Von den Pigmenten der untersuchten Bläuepilzen wurden vor bzw. nach Hydrolyse IR-Spektren in KBr aufgenommen (Abb. 23). Die Spektren vor Hydrolyse zeigen sowohl bei *C. coerulescens* als auch bei *A. alternata* eine breite Bande bei 3440 cm^{-1} (OH-Gruppe), weitere Banden bei 2920 sowie 2850 cm^{-1} (aliphatische CH-Gruppe), eine Bande bei 1710 cm^{-1} (C=O der COOH-Gruppe), eine starke Bande bei 1640 cm^{-1} (C=O, oder aromatische C=C und/oder Amidbande I) und bei 1520 cm^{-1} (Amidbande II), eine weniger starke Bande bei 1450 cm^{-1} und eine gut definierte Bande bei 1390 cm^{-1} (C-CH₃-Gruppe) eine Bande bei 1140 cm^{-1} (C-O-Gruppe der Alkohole und/oder aromatische CH-Gruppe) sowie eine Schulter bei 910 cm^{-1} (aromatische CH- und/oder aliphatische CH-Gruppe). Unterschiede zwischen den Pigmenten beider Pilze ergaben sich vorwiegend im kürzeren Wellenlängenbereich. Die im Pigmente von *A. alternata* bei 1710 cm^{-1} vorkommende Bande ist bei *C. coerulescens* nur im Ansatz ausgebildet, während sich bei *C. coerulescens* im Vergleich zu *A. alternata* die Bande bei 1140 cm^{-1} deutlicher hervorhebt.

Der Vergleich der Spektren beider Pigmente vor mit denen nach Hydrolyse zeigt, daß die Farbstoffe beider Pilze vor Hydrolyse mit Eiweißsubstanzen assoziiert sind. An Hand der IR-Spektren wird dies durch die Banden bei 1640 und 1520 cm^{-1} , die den Amidbanden von Proteinen zuzurechnen

sind, deutlich. Nach Hydrolyse zeigt sich bei *C. coerulescens* nur noch eine leichte Schulter bei 1520 cm^{-1} , die Bande bei 1660 cm^{-1} ist verschwunden. Bei *A. alternata* ist nach Hydrolyse keine Absorption bei 1640 und 1520 cm^{-1} mehr vorhanden. Die vor Hydrolyse leichte Schulter bei 1710 cm^{-1} ist nach Hydrolyse deutlicher, stellt sich als Peak dar und zeigt das Vorhandensein von Carboxylgruppen in den Pigmenten an. Ansonsten sind die vor Hydrolyse vorhandenen Banden auch nach Hydrolyse noch sichtbar, d.h. die Grundstruktur der Pigmente wird durch die Hydrolyse nicht beeinflusst.

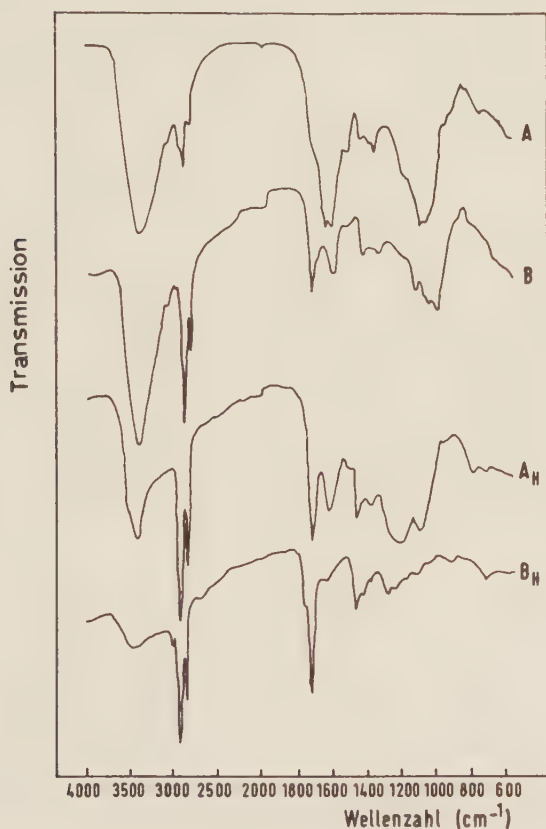


Abb. 23: Vergleich der IR-Spektren vor Hydrolyse von *C. coerulescens* (A) und *A. alternata* (B) sowie nach Hydrolyse (A_H) und (B_H).

Mit Hilfe der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie) wurde ein detaillierter Vergleich der Pigmente von *C. coerulescens* und *A. alternata* vorgenommen. Nach einem zweistufigen Verfahren, verbunden mit einer mathematischen Rechenoperation gelangt man indirekt zum eigentlichen IR-Spektrum. In der ersten Stufe dieses Verfahrens wird ein Interferogramm erzeugt, das in der zweiten Stufe mathematisch durch Fourier-Transformation in ein IR-Spektrum umgewandelt wird. Neben anderen Vorteilen hat das FTIR-Gerät einen größeren Linearitätsbereich und eine bessere Wellenlängengenauigkeit.

Die FTIR-Absorptionsspektren von *C. coerulescens* und *A. alternata* (Abb. 24) zeigen bei beiden Pigmenten starke Banden bei 2920 , 2850 cm^{-1} (aliphatische C-H-Streckschwingung) und bei 1450 cm^{-1} (aliphatische C-H-Deformationsschwingung). Was für einen überwiegend aliphatischen Aufbau der Polymere spricht. Die Banden bei 1390 cm^{-1} und die Banden im 1000 cm^{-1} Bereich können C-CH₃-Biegungs- und Skelettviibration der aliphatischen Gruppen zugerechnet werden. Banden im Bereich von $1000\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ werden "aus der Ebene"-Deformationsschwingungen von verschiedenen konjugierten und nicht konjugierten Alkenen zugeordnet (Williams und Fleming, 1973). Die Bande bei 1630 cm^{-1} steht für aromatische Skelett-Vibrationen, C=C konjugiert mit C=O-Gruppen und antisymmetrische Streckschwingungen der COOH-Gruppe. Bei 1710 cm^{-1} zeigt sich die Carbonylbande der COOH-Gruppe. Peaks bei 1220 , 1140 und 1090 cm^{-1} beruhen auf C-O- Streck- und OH-Deformationsschwingungen vieler Gruppen wie Carboxyl-, Alkohol-, Ether- und Estergruppen. Die Bande bei 1140 cm^{-1} kann auch aus aromatische C-H-Gruppen resultieren.

Zur Illustration der quantitativen Unterschiede wurde ein Subtraktionsspektrum (*A.alternata* - $1,000 \cdot$ *C. coerulescens*) (Abb. 25) aufgenommen. Es zeigt sich, daß die Absorption bei 2920 und 2850 cm^{-1} bei *C. coerulescens* stärker ist als bei *A. alternata*. Dagegen dominiert die Absorption im Wellenlängenbereich von $2000\text{--}450\text{ cm}^{-1}$ bei *A. alternata*. Da der Unterschied maximal $0,2$ Absorptionseinheiten beträgt, muß davon ausgegangen werden, daß beide Pigmente aus den gleichen, vorwiegend aliphatischen, Bausteinen aufgebaut sind.

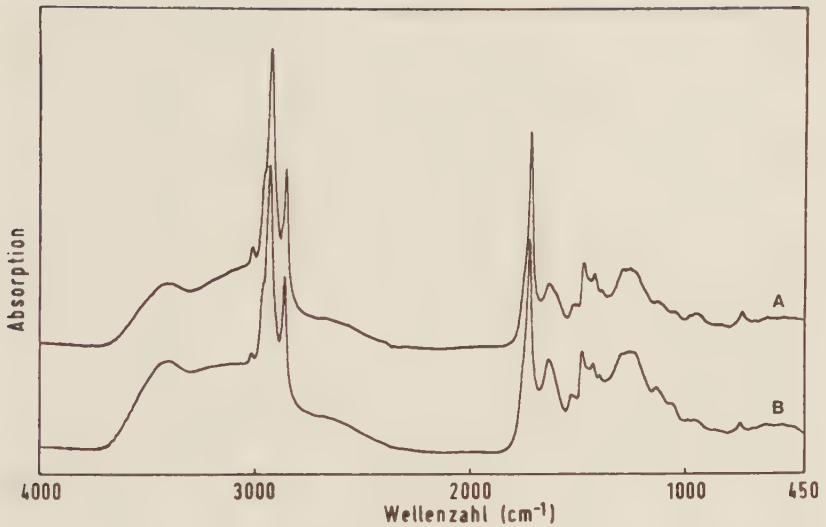


Abb. 24: FTIR-Absorptionsspektren von *C. coerulescens* (A) und *A. alternata* (B).

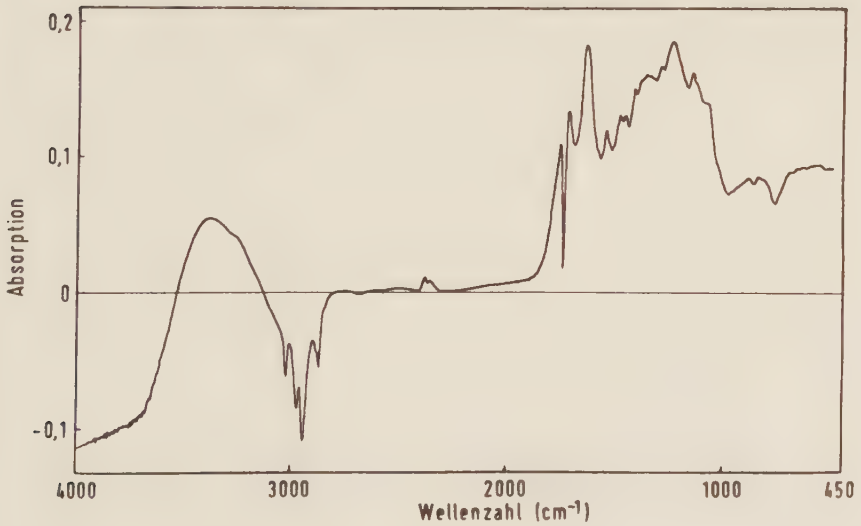


Abb. 25: FTIR-Subtraktionsspektrum
(*A. alternata* - 1,000 * *C. coerulescens*).

In Abb. 26 sind die IR-Spektren der Pigmente von *C. coeruleus* und *A. alternata* nach Hydrolyse und der Vergleichsmelanine dargestellt. Die bereits von Jones (1970) als charakteristische Banden für Melanine beschriebenen Absorptionen um 3450, 1700, 1615, 1240 und 830 cm^{-1} sowie diffuse Absorptionen im Bereich von 3300-2400 cm^{-1} können sowohl bei den Pilz-Substanzen als auch bei den Vergleichsmelaninen im IR-Spektrum nachgewiesen werden. Auf CH-Gruppen zurückzuführende Banden im Bereich von 2960-2850 und 1450 cm^{-1} , sowie auf C=O-Gruppen basierende Absorptionen um 1700 cm^{-1} sind in den IR-Spektren der untersuchten Substanzen vorhanden. Im "finger-print"-Bereich 950-700 cm^{-1} ist keine eindeutige Identifizierung der Banden möglich.

Die IR-Spektren der drei Vergleichsmelanine zeigen im Gegensatz zu den Pilz-Melaninen ganz schwache, nur im Ansatz vorhandene, Banden bei 2920 und 2850 cm^{-1} (aliphatische CH-Gruppe), was auf einen weniger aliphatischen Aufbau von Tyrosin-, Dopa- und Catechol-Melanin hinweist. Außerdem ist bei den Vergleichsmelaninen die Bande bei 1640 cm^{-1} viel intensiver. Da die Vergleichsmelanine nicht mit Protein assoziiert sind, ist die Bande bei 1640 cm^{-1} der Carbonylgruppe zuzuordnen.

Untereinander zeigen die IR-Spektren von Tyrosin-, Dopa- und Catechol-Melanin eine weitgehende Übereinstimmung.

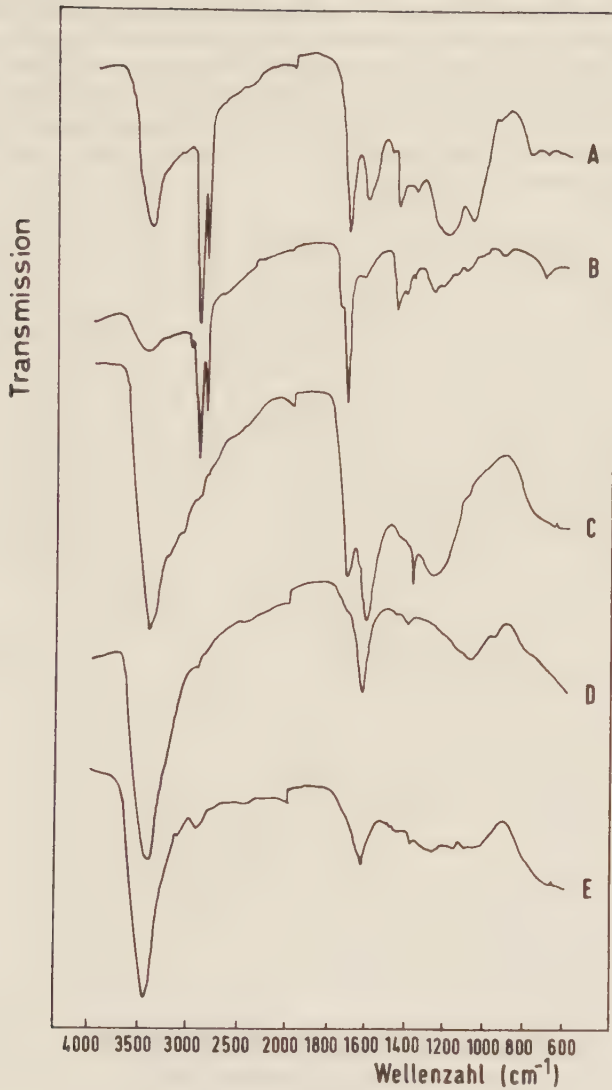


Abb. 26: Vergleichende Darstellung der IR-Spektren nach Hydrolyse. A: *C. coerulescens*, B: *A. alternata*, C: Tyrosin-Melanin, D: Dopa-Melanin, E: Catechol-Melanin.

Die Vergleichsmelanine und die Melanine der untersuchten Bläuepilze nach Hydrolyse wurden mit Natriumborhydrid (NaBH_4) reduziert. Nach Reduktion kam es bei allen fünf untersuchten Substanzen zu einer Entfärbung, die Proben wurden heller. In den IR-Spektren (Abb. 27) ist nach Reduktion eine deutlich intensivere Bande bei 1390 cm^{-1} , die der C-CH_3 -Gruppe entspricht, vorhanden. Die Bande bei 1640 cm^{-1} verliert an Intensität, was einer Verminderung der C=O -Gruppen gleich kommt. Die OH-Bande bei 3440 cm^{-1} bleibt unverändert bestehen.

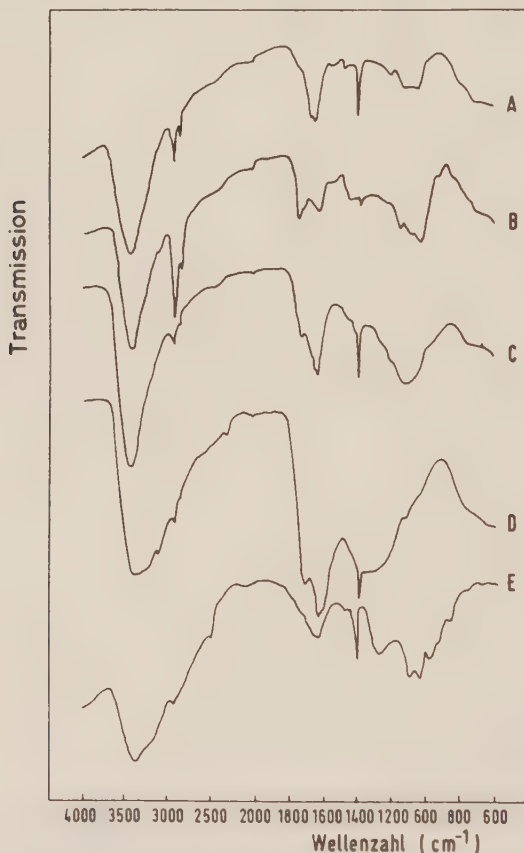


Abb. 27: IR-Spektren Vergleich nach Reduktion mit NaBH_4
A: *C. coerulenscens*, B: *A. alternata*, C: Tyrosin-Melanin,
D: Dopa-Melanin, E: Catechol-Melanin.

Gleichfalls wurden IR-Spektren nach Acetylierung aufgenommen (Abb. 28). Durch Acetylierung kommt es zu einer Abschwächung der Bande bei 3440 cm^{-1} (OH-Gruppe) und zu einer Intensivierung der Bande bei 1390 cm^{-1} (C-CH₃-Gruppe). Die Bande bei 1710 cm^{-1} (C=O der COOH-Gruppe) wird viel schwächer, die bei 1190 cm^{-1} stärker und der Bereich von $1200\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ spaltet sich viel intensiver und detaillierter auf.

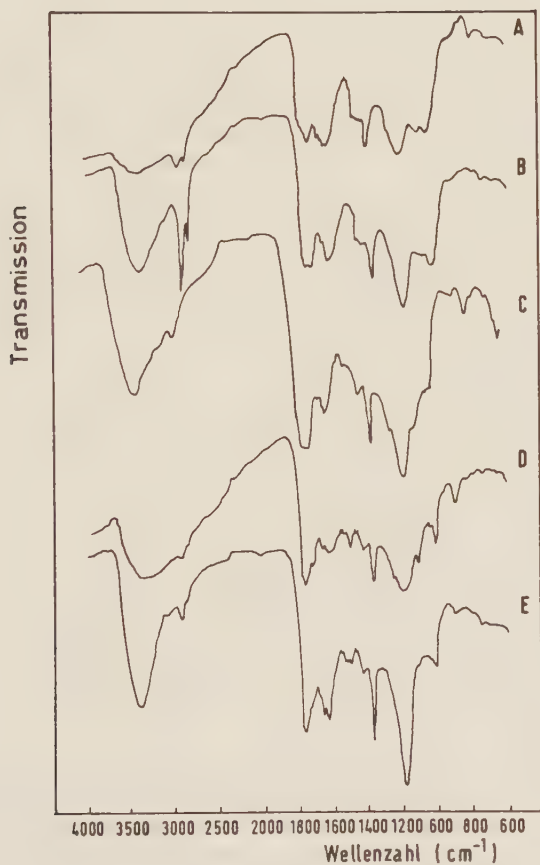


Abb. 28: IR-Spektren der acetylierten Proben von A: *C. coerulescens*, B: *A. alternata*, C: Tyrosin-Melanin, D: Dopa-Melanin, E: Catechol-Melanin.

6.2.1.3. Kernresonanzspektroskopie (^1H - und ^{13}C -NMR)

Eine weitere Art der Absorptionsspektroskopie ist die Kernresonanzspektroskopie, die auch als NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance) bezeichnet wird. Das NMR-Spektrum entsteht dabei durch Absorption elektromagnetischer Strahlung durch Atomkerne, die auf Grund einer ungeraden Zahl von Neutronen oder Protonen ein magnetisches Moment besitzen und sich in einem statischen äußeren Magnetfeld befinden.

Die NMR-Spektroskopie hat nicht nur im Bereich verschiedener anderer Naturstoffe, sondern auch bei aus Pilzen extrahierten Melaninen (Gonzalez-Vila et al., 1978; Lüdemann et al., 1982)), Huminstoffen oder ähnlichen Verbindungen bemerkenswerte Erfolge erbracht (Gonzalez-Vila et al., 1976; Sciacovelli et al., 1977; Lentz et al., 1977).

Das bis heute noch am meisten verbreitete Verfahren ist die PROTONENRESONANZ-SPEKTROSKOPIE (^1H -NMR-SPEKTROSKOPIE). Zur Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren wurden die Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* in 0,1 n Deuteronatronlauge bei einer Frequenz von 360 MHz aufgenommen. In den Abb. 29 und 30 sind die ^1H -NMR-Spektren der untersuchten Proben vor bzw. nach Hydrolyse dargestellt.

Durch den Vergleich der Spektren wurde festgestellt, daß die Verschiebung der Absorptionssignale nach Hydrolyse nur unwesentlich (1 ppm) und daher vernachlässigbar ist. Das ^1H -NMR-Spektrum von *C. coerulescens* zeigt, daß das Signal vor Hydrolyse bei 0,82 ppm auch nach Hydrolyse konstant bleibt. Ebenfalls bleiben Absorptionssignale bei 1,25 und 1,52 ppm auch nach Hydrolyse unverändert, während ein Peak bei 1,66 ppm zusätzlich feststellbar ist. Das Signal bei 2,02 ppm mit einer Schulter bei 2,18 ppm spaltet sich nach Hydrolyse zu einem Duplett (2,02 und 2,12 ppm) auf. Statt des Peaks bei 2,68 ppm mit einer Schulter bei 2,55 ppm tritt nach Hydrolyse ein schwaches Singulett bei 2,75 ppm auf. Dominant ist, daß nach Hydrolyse der ganze Signalbereich ab 3,3 bis 3,6 ppm fehlt. Sehr schwache Absorptionssignale bei 3,6, 3,8 und 5,3 ppm sind auch nach Hydrolyse noch feststellbar, während die Signale im höheren Frequenzbereich (6,5 bis 7,6 ppm) fehlen.

Bei dem Melanin von *A. alternata* zeigen die ^1H -NMR-Spektren ein ähnliches Bild. Das Signal bei 0,82 ppm ist nach Hydrolyse ebenso feststellbar (0,85 ppm), wie Signale bei

1,28 und 1,51 ppm. Zusätzlich tritt nach Hydrolyse ein sehr schwaches Signal bei 1,68 ppm auf. Das Multiplett im Bereich von 1,99 bis 2,2 ppm spaltet sich nach Hydrolyse in ein Duplett auf. Der Peak bei 2,7 ppm tritt auch nach Hydrolyse noch auf, während der Signalbereich von 3,3 bis 3,6 ppm fehlt. Das Signal bei 5,28 ppm hat sich nicht verändert, während Absorptionssignale im Bereich von 6,5 bis 7,3 ppm nach Hydrolyse nicht mehr erscheinen.

Die Verschiebungen im Gebiet von 1,2 ppm können stark abgeschirmten aliphatischen CH_2 -Gruppen zugerechnet werden. Aliphatische Seitenketten gebunden an aromatischen Ringen sollten die Verschiebungen im Bereich von 3,1 ppm zur Ursache haben (Neyroud und Schnitzer, 1974). Da nach der Hydrolyse Peaks im Gebiet von 3,3 bis 3,6 ppm sowohl bei *C. coerulescens* als auch bei *A. alternata* fehlen, und mit Hilfe der Hydrolyse Kohlenhydrate und Proteine abgespalten worden waren, kann dieser Bereich diesen Stoffgruppen zugeordnet werden. Die Absorptionssignale bei 3,7 und 3,9 ppm sind den funktionellen Gruppen OCH_3 und CO_2CH_3 zuzuordnen (Neyroud und Schnitzer, 1974). Besonders auffallend ist das Fehlen von Peaks nach Hydrolyse im Bereich von 6,5 bis 7,3 ppm. In diesem Bereich sind Signale von aromatischen Protonen anzusiedeln. Es darf aber auf Grund des Fehlens dieser Signale keinesfalls auf das Fehlen von aromatischen Ringen nach Hydrolyse geschlossen werden. Vielmehr muß davon ausgegangen werden, daß aromatische Ringe der Substanz ganz oder nahezu ganz mit anderen Substituenten als Wasserstoff-Atomen besetzt sind. Zum zweiten kann die Anwesenheit von Radikalen, wie sie Commoner et al. (1954) und Sealy (1980) bei Melaninen und Schnitzer und Khan (1972) bei Huminstoffen nachgewiesen haben, die Relaxation aufheben (Neyroud und Schnitzer, 1974). Auf Grund der Ergebnisse, die an Hand der ^1H -NMR-Spektren erhalten wurden, kann geschlossen werden, daß die Grundstruktur der Polymere durch Hydrolyse nicht beeinflusst wird.

Ein Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von *C. coerulescens* und *A. alternata* zeigt die beinahe identische Zusammensetzung der Polymere (Abb.31). Die hauptsächlich aus aliphatischen Elementen aufgebaute Struktur der Polymere ist gut erkennbar. Doch darf, wie schon vorher erwähnt, nicht ausgeschlossen werden, daß aromatischen Strukturelemente im Polymer vorhanden sind.

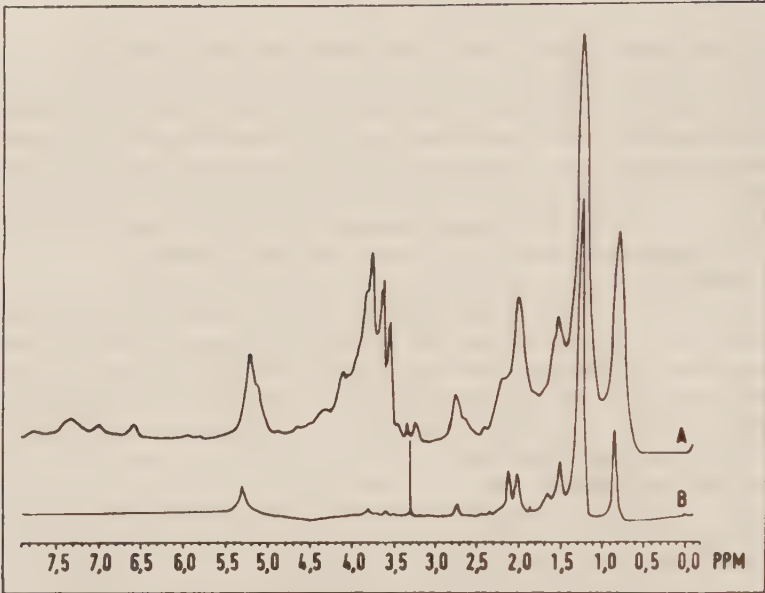


Abb. 29: 360 MHz ¹H-NMR-Spektren von *C. coerulescens* vor Hydrolyse (A) und nach Hydrolyse (B).

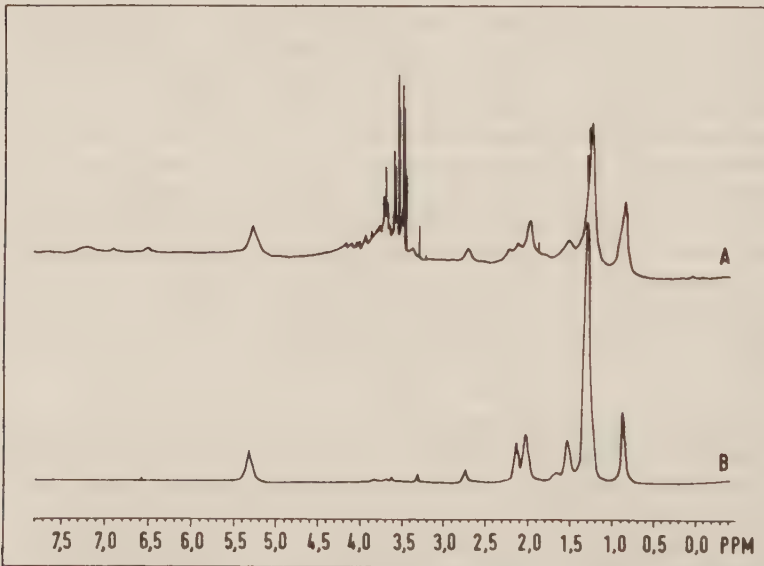


Abb. 30: 360 MHz ¹H-NMR-Spektren von *A. alternata* vor Hydrolyse (A) und nach Hydrolyse (B).



Abb. 31: Gegenüberstellung der 360 MHz ^1H -NMR-Spektren von
A: *C. coerulescens* und B: *A. alternata*.

In den letzten Jahren erlangte die ^{13}C -KERNRESONANZ-SPEKTROSKOPIE (^{13}C -NMR-Spektroskopie) große Bedeutung. ^{13}C -NMR-Spektroskopie wurde zum Studium vieler polymerer Naturstoffe herangezogen. Erfolgreich wird die ^{13}C -NMR-Technik bei Ligninen und seinen Modellsubstanzen (Lüdemann und Nimz, 1974; Nimz und Lüdemann, 1976; Mörck und Kringstad, 1985; Mörck et al., 1986) sowie bei Huminstoffen (Gonzalez-Vila et al., 1976; Hatcher et al., 1980a, 1980b, 1981) angewandt. Von aus Pilzen extrahierten Melaninen liegen ebenfalls NMR-Studien vor (Gonzalez-Vila et al., 1978; Lüdemann et al., 1982).

Die Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* wurden nach Hydrolyse mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie untersucht. Das Ergebnis gibt Abb. 32 wieder.

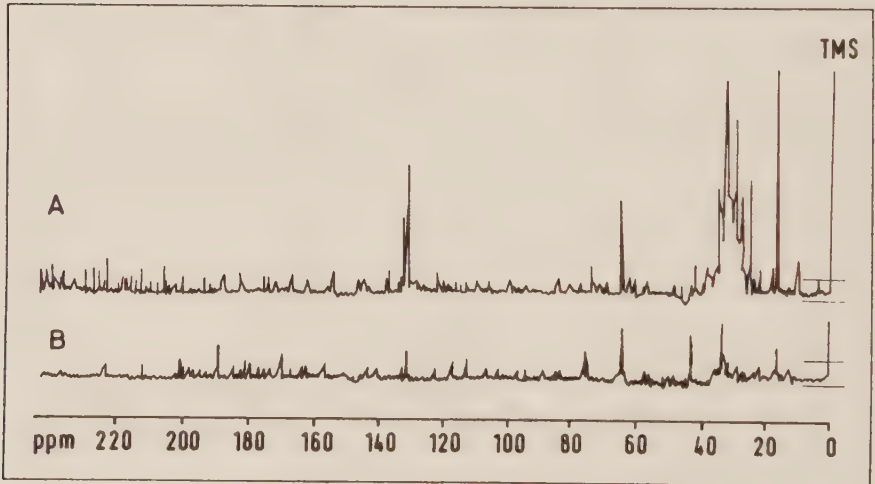


Abb. 32: Vergleichende Darstellung der ^{13}C -NMR-Spektren von A: *C. coerulescens* und B: *A. alternata* nach Hydrolyse. Die mittlere vorhandene Untergrundschwingung ist durch zwei horizontale Striche markiert.

Die Spektren zeigen Signale im Aliphaten- und/oder Proteinbereich (10-50 ppm), sowie in der Polysaccharid-region (50-100 ppm). Im aromatischen Bereich (100-160 ppm) sind überwiegend sehr schwache Signale, eine Ausnahme stellen die Peaks bei 130 und 132 ppm dar. Weiterhin treten Signale im C=O - und COOH-Bereich (160-180 ppm) auf (Gonzalez-Vila et al., 1976; Lüdemann et al., 1982). An Hand der Spektren wird deutlich, daß auch nach Hydrolyse (ca. 50-70 % Verlust an N) immer noch "Protein-Signale" auftreten. Das läßt darauf schließen, daß nicht alles "Protein" durch Hydrolyse abgespaltet wurde, sondern wie Haider et al. 1965 und 1975 beschrieben als nicht-hydrolysierbares Protein gebunden an den aromatischen Ringen vorliegt. Die Komplexität der Polymere zeigt sich an Hand der ^{13}C -NMR-Spektren in Form von Peaks, Schultern oder Plateaus in den Signalbereichen von aliphatischen -, Protein -, Polysaccharid -, aromatischen -, Carbonyl- und Carboxylgruppen wieder.

Entsprechend dem hohen Molekulargewicht und der großen Komplexität ist anzunehmen, daß bei den Melaninen von *C. coerulescens* und *A. alternata* eine chemische Verschiebung der Signale um ± 5 -10 ppm ähnlich den Melaninen und Huminstoffen (Gonzalez-Vila et al., 1976, 1978; Lüdemann et al., 1982) stattfinden kann. Aus der Literatur (Lüdemann und Nimz, 1974) ist bekannt, daß mehr als ein Substituent am aromatischen Ring eine chemische Verschiebung an allen Ring-C-Atomen bewerkstelligen kann. Da innerhalb des Polymers mit reaktionsträgen und reaktionsfähigen Stellen zu rechnen ist (Accessibilität), darf auf keinen Fall der Schluß gezogen werden, daß nicht vorhandene Signale das Fehlen der entsprechenden Gruppe darstellen. Auch darf an Hand der Peak-Intensität nicht auf die tatsächliche Konzentration geschlossen werden. In der Tab. 1 werden die Signale der ^{13}C -NMR-Spektren im Zusammenhang mit den möglichen Gruppen diskutiert (Breitmaier und Voelter, 1974; Levy und Nelson, 1972; Stothers, 1972; Gonzalez-Vila et al., 1976, 1978; Lüdemann et al., 1982).

Tab. 1: Chemische Verschiebung der ^{13}C -Atome bei den aus Bläuepilzen extrahierten Melaninen und ihre mögliche Zuordnung.

ppm	<i>C. coerulescens</i>	<i>A. alternata</i>	
200			$\left. \begin{array}{l} \text{C} = \text{O} \\ \text{Ketone} \\ \text{Chinone} \\ \text{COOH} \end{array} \right\}$
190	188	188	
180			
170	169	168	
160			$\left. \begin{array}{l} \text{aromatische} \\ \text{und hetero-} \\ \text{aromatische} \\ \text{Ringe} \end{array} \right\}$
150			
140	132	132	
130	130		
120			
110			$\left. \begin{array}{l} \text{Alkohole,} \\ \text{aliphatische} \\ \text{CH}_3, \beta\text{-Kohlen-} \\ \text{stoffe} \\ \text{Kohlenhydrate} \end{array} \right\}$
100			
90			
80			
70	75	75	
60	65	65	$\left. \begin{array}{l} \text{aliphatische} \\ \text{Kohlenstoffe} \\ \alpha, \beta, \gamma\text{-C} \\ \text{(Aminosäuren)} \\ \text{OCH}_3 \end{array} \right\}$
50			
40	42	42	
30	34	34	
20	18	18	
10			

6.2.1.4. Massenspektroskopie

Ein weiteres analytisches Verfahren ist die Massenspektroskopie (MS), bei dem eine zu untersuchende Substanz im gasförmigem Zustand unter hohem Vakuum ionisiert und fragmentiert wird. Die nach der Ionisation geladenen Partikel werden in einem elektrischen Feld beschleunigt, im Magnetfeld nach ihrem Masseladungsverhältnis getrennt und entsprechend ihrer Intensität registriert.

Wegen des hohen Molekulargewichts der untersuchten Melanine wurden die Proben vor der Aufnahme der Massenspektren pyrolysiert. Unter Pyrolyse (PY) versteht man eine Zersetzung von Substanzen durch Hitze.

Von den zu untersuchenden Melaninen von *C. coerulescens* und *A. alternata* wurden Pyrolyse-Massenspektren (PY-MS) vor bzw. nach Hydrolyse angefertigt (Abb.33 und 34). Die Spektren beider Melanine zeigen vor Hydrolyse eine Übereinstimmung in den Ionenserien $m/e = 67, 81$ und 95 (Pyrrole) sowie $m/e = 94, 108$ und 122 (Phenole). Weitere Signale stammen von stickstoffhaltigen Komponenten und sind gleich denen, die man nach der Pyrolyse im Massenspektrum von Proteinen findet (Meuzelaar et al., 1973, 1974). Die Signale bei $m/e = 67, 79, 81, 93, 95, 107, 117, 131$ und 145 sind typisch für Proteinmaterial und können mit Heterozyklen (Pyrrol, Pyridin, Indol) in Verbindung gebracht werden. Dies ist ein weiterer Beweis für die Assoziation der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* mit proteinartigem Material.

Signale bei $m/e = 60$ (Essigsäure), 68 (Furan), 82 (Methylfuran), 96 (Furfural oder Dimethylfuran), 98 (Furfurylalkohol) und Signale der teilweise methylierten Derivate bei $m/e = 112$ und 126 können ebenfalls identifiziert werden. Aus der Literatur (Posthumus et al., 1974; Schulten et al., 1973) ist bekannt, daß diese Massen bei der Pyrolyse von Polysacchariden auftreten. Die Spektren der untersuchten Bläuepilze zeigen zusätzlich schwache Signale bei $m/e = 114$ und 128 (Desoxyhexose und Pentose) (Saiz-Jimenez, 1983). Demzufolge sind die Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* neben Proteinen zusätzlich mit Polysacchariden assoziiert.

Auf aliphatische Verbindungen, wie Alkene wird durch eine Serie von Signalen bei $(m/e = 56, 70$ und $84)$ hingewiesen. Aromatische Fragmente wie Benzol ($m/e = 78$), Toluol ($m/e = 92$), Phenol ($m/e = 94$) und Kresol ($m/e = 108$) können an Hand

ihrer Massen identifiziert werden. Auch im höheren Massenbereich zeigen die Spektren der Melanine Signale. Auf Alkylphenole deuten die Massen $m/e = 122$, 136 , 150 und 164 (Meuzelaar et al., 1977; Saiz-Jimenez, 1983) hin, während die Massen bei $m/e = 124$ bzw. 138 für Di- bzw. Trihydroxytoluole stehen (Saiz-Jimenez, 1983)

Nach Hydrolyse können an Hand der Pyrolyse-Massenspektren von *C. coerulescens* und *A. alternata* einige Veränderungen festgestellt werden. Massen ($m/e = 67$, 81 , 95 und 117), welche typisch für Fragmente von Proteinen sind, werden bei *A. alternata* schwächer, während bei *C. coerulescens* eher eine Konstanz der Signale zu vermerken ist. Dieser Befund ist im Einklang mit der Hypothese (Haider et al., 1965, 1975) des nichthydrolysierbaren proteinartigen Anteils im Polymer. Zusätzlich verlieren die für Polysaccharide stehenden Signale an Intensität. Signale aliphatischer Elemente bleiben annähernd auf gleichem Niveau, bei dem Melanin von *A. alternata* wird die Masse $m/e = 70$ (Penten) stärker. Signale aromatischer Strukturen wie Benzol, Toluol und Kresol gewinnen ebenfalls an Intensität.

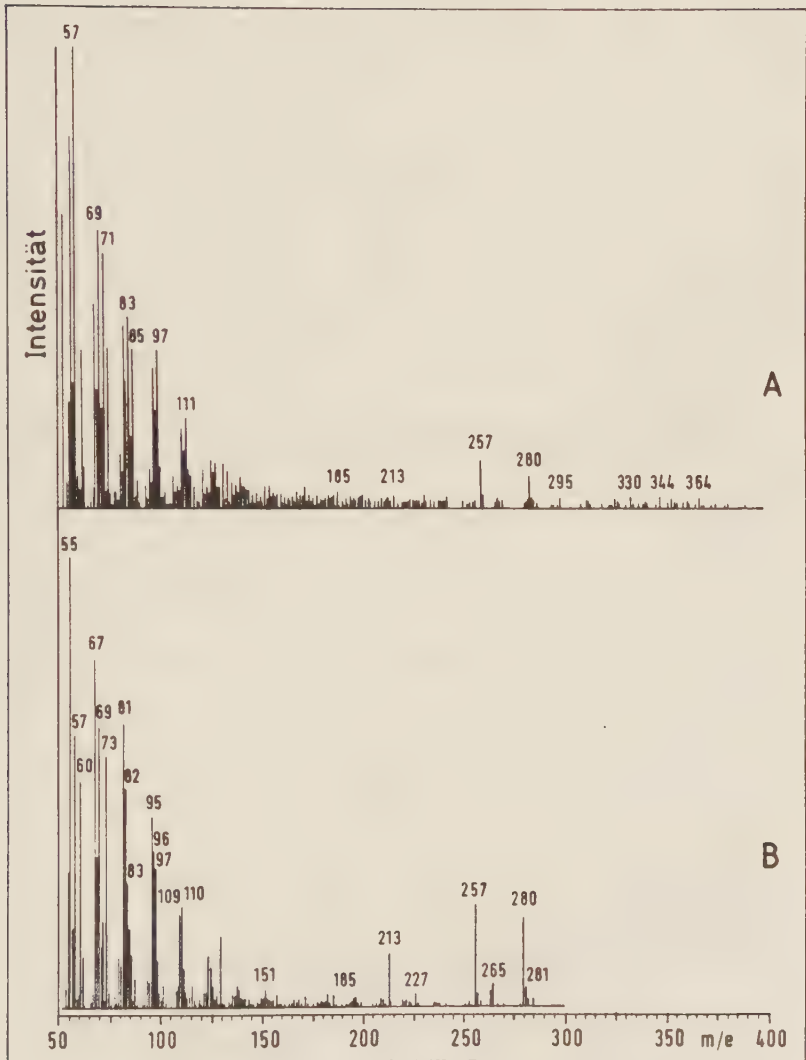


Abb. 33: Pyrolyse-Massenspektren von *C. coerulescens* vor Hydrolyse (A) und nach Hydrolyse (B).

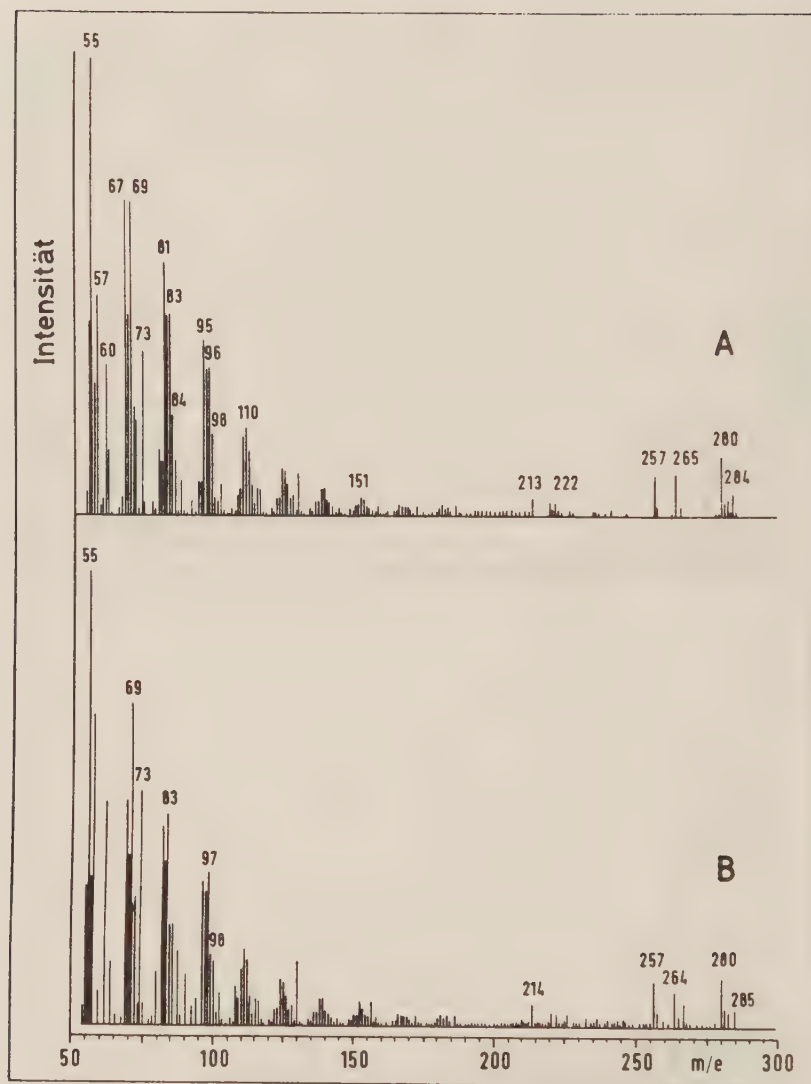


Abb. 34: Pyrolyse-Massenspektren von *A. alternata* vor Hydrolyse (A) und nach Hydrolyse (B).

6.2.2. Daten aus der Elementaranalyse

Die Melanine der untersuchten Pilze *C. coerulescens* und *A. alternata* wurden vor bzw. nach Hydrolyse einer CHN-Analyse unterworfen. In Tab.2 sind die ermittelten Daten aufgeführt. An Hand der Werte aus der Elementaranalyse zeigt sich sowohl bei *C. coerulescens* als auch bei *A. alternata* eine Übereinstimmung der gefundenen CHNO-Werte mit den Daten aus der Literatur. Elementaranalysen von aus Pilzen extrahierten Melaninen ergeben nach Angaben in der Literatur C-Werte von 49,1 bis 62,9% (Schnitzer et al., 1973; Saiz-Jimenez et al., 1975; Saiz-Jimenez, 1983). Der N-Wert bewegt sich zwischen 1 und 11% und ist abhängig von der Spezies, der Art, sowie dem Stickstoffgehalt des Nährmediums. Der H-Wert liegt im Bereich um 8% (Saiz-Jimenez, 1983).

Durch Hydrolyse kommt es zu einem großen Stickstoffverlust (71 bzw. 50%). Diese großen Stickstoffeinbußen bestätigen die Erkenntnisse aus der NMR- und Massenspektroskopie vom Vorhandensein von proteinartigem Material in den Polymeren. Ob die proteinartige Komponente einem im biochemischen Sinn verstandenen Protein entspricht konnte in einem Punkt (Aminosäuren-Analyse s. 6.2.4.) bestätigt werden.

Tab.2: Vergleich der melaninartigen Polymere vor und nach Hydrolyse.

[%]	<i>Ceratocystis coerulescens</i>		<i>Alternaria alternata</i>	
	Hydrolyse		Hydrolyse	
	vorher	nachher	vorher	nachher
C	46,64	54,95	55,60	64,49
H	7,08	7,06	7,90	9,30
N	8,38	2,45	3,65	1,82
O*	37,90	35,54	32,85	24,39
Gew.-Verlust nach Hydrolyse	—	52,17	—	50,50
Gew.-Verlust N	—	70,78	—	50,14
Asche	1,0	0,74	0,63	0,19
OCH ₃	1,87	1,20	1,95	1,23

*wurde rechnerisch bestimmt

Die Aschewerte sind mit 1% und kleiner relativ niedrig. Durch energiedispersive Röntgenanalyse (EDXA) konnte die elementare Zusammensetzung der Asche bestimmt werden (Abb. 35). Die Elemente Na, Al, Si, P, Cl, K und Ca wurden dabei nachgewiesen.

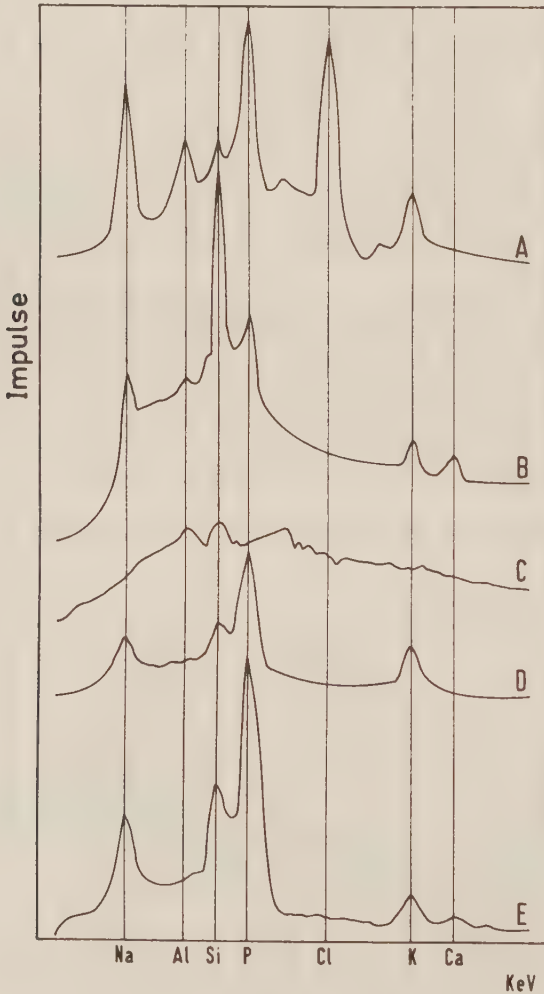


Abb. 35: EDXA-Spektren der Aschen von A: *C. coerulescens*, B: *A. alternata*, C: Dopa-Melanin, D: Tyrosin-Melanin, E: Catechol-Melanin

Mit den Werten der CHN-Analyse wurden einige Berechnungen vorgenommen. In Tab.3 sind neben den ermittelten CHN- und E_4/E_6 -Werten die berechneten Daten aufgelistet. Es zeigt sich, daß es sich bei den untersuchten Melaninen von *C. coerulescens* und *A. alternata* um sehr komplexe Polymere mit überwiegend aliphatischer Struktur handelt (H/C-Verhältnis). Van Krevelen postulierte schon 1950, daß bei einem H/C-Verhältnis von 1,4 bis 1,7 ca. 55 bis 75 % der C-Atome in aliphatischer Form vorliegen müssen. Das reziproke Verhältnis (C/H) gibt Auskunft über aromatischen Charakter der Polymere. Je höher das C/H-Verhältnis ist, desto mehr aromatische Ringe beinhaltet das Polymer. Das C/H-Verhältnis von *C. coerulescens* ist höher als das von *A. alternata*. Demzufolge muß das Melanin von *C. coerulescens* aus mehr aromatischen Elementen, als das von *A. alternata* aufgebaut sein. Die Vergleichsmelanine, vor allem Tyrosin- und Catechol-Melanin, enthalten deutlich mehr aromatische Gruppen als die Melanine der Bläuepilze. Das C/H-Verhältnis von Dopa-Melanin liegt zwar über den C/H-Verhältnissen der Melanine der Bläuepilze, doch ist hier der Unterschied, vor allem im Vergleich zu dem Melanin von *C. coerulescens*, gering. Die O/C-Werte sind bis auf das Melanin von *A. alternata* nahezu gleich und deuten einen ähnlichen Grad an Sauerstoffs substituenten an. Das O/C-Verhältnis von *A. alternata* ist um ein Drittel geringer. Auf Grund der E_4/E_6 -Werte muß davon ausgegangen werden, daß alle fünf untersuchten Melanine sehr komplex sind.

Tab. 3: Daten aus der Elementaranalyse und Verhältnis E_4/E_6 .

	C (%)	H (%)	N (%)	O* (%)	C/H	O/C	H/C	C/N	E_4/E_6
<i>C. coerulescens</i>	54,95	7,06	2,45	35,54	0,65	0,49	1,53	26,16	3,76
<i>A. alternata</i>	64,49	9,30	1,82	24,39	0,58	0,28	1,73	41,35	3,87
Tyrosin-Melanin	54,43	3,67	6,85	35,05	1,24	0,48	0,80	9,26	3,19
Dopa-Melanin	51,93	6,64	6,90	34,53	0,66	0,50	1,52	8,66	2,72
Catechol-Melanin	62,49	3,19	0,81	33,51	1,63	0,40	0,61	104,0	1,80

* wurde rechnerisch bestimmt

Die Werte der Vergleichssubstanzen stehen mit denen aus der Literatur (Kitamura und Kondo, 1958; Piatelli et al., 1965) bekannten Daten im Einklang.

Bei der Bestimmung der CHN-Werte muß mit Abweichungen in den einzelnen Versuchen gerechnet werden. Grund hierfür ist, daß Melanine aus verschiedenen Extraktionen untersucht wurden. Die Melanogenese verläuft nicht immer gleich, zudem können oxidative und decarboxylierende Reaktionen qualitativ und quantitativ unterschiedlich ablaufen. Auch bedingt die hohe Komplexität und Unregelmäßigkeit der Polymere diverse Unterschiede. Dopa-Melanin muß entsprechend den ermittelten Daten einen geringeren Teil an aromatischen Gruppen als Tyrosin-Melanin enthalten. Dieser Aufbau kann durch die gewählten Synthesebedingungen zu Stande kommen. Ebenfalls auf die Synthesebedingungen bzw. auf Verunreinigungen kann der Stickstoffgehalt von Catechol-Melanin zurückzuführen sein.

6.2.3. Bestimmung der funktionellen Gruppen

Die Klassifizierung organischer Verbindungen nach ihren funktionellen Gruppen bietet eine gute Möglichkeit, um eine Übersicht über ihre Vielfalt zu gewinnen und um ihr chemisches Verhalten und ihre Konstitution zu ermitteln. Aufschlußreicher als die elementare Zusammensetzung sind aus diesem Grund Art und Gehalt der funktionellen Gruppen. An Hand der Werte wird eine Information über die Reaktivität der Substanz gegeben. Es darf aber keinesfalls angenommen werden, daß die Bestimmung der funktionellen Gruppen eine genaue Verhaltensanalyse der untersuchten Substanz ergibt, dazu müßte der Gehalt der erfaßten funktionellen Gruppen gleich der in situ funktionsfähigen Gruppen sein. (Ziechmann, 1980).

Die ermittelten Werte aus der Bestimmung der funktionellen Gruppen sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Die Gesamtacidität liegt bei den fünf untersuchten Melaninen zwischen 2,72 und 4,04 meq/g. Die Acidität beruht vorwiegend auf phenolischen OH-Gruppen. Die Ausnahme ist Catechol-Melanin, bei dem der saure Charakter des Polymers zu gleichen Teilen von COOH- und phenolischen OH-Gruppen verursacht wird. Den dominierenden Teil der Gesamt-OH-Gruppen stellen die aliphatischen OH-Gruppen mit 66-82% dar. Die Carbonylwerte bewegen sich zwischen 6,45-9,56 meq/g. Es wurde versucht die Carbonyl-

werte hinsichtlich ihrer Herkunft aus Keton bzw. Chinon zu untersuchen. Dabei wurde festgestellt, daß in den Melaninen von *C. coerulescens* 47%, sowie von *A. alternata* 54%, beim Tyrosin-Melanin 30%, beim Dopa-Melanin 33% und beim Catechol-Melanin 38% der Carbonylgruppen in Form von chinoiden Strukturen vorliegt.

Tab. 4: Zusammenfassende Darstellung der funktionellen Gruppen.

	OCH ₃	Gesamt- [*] acidität	COOH	phenolische OH	aliphatische [*] OH	Gesamt- OH	Gesamt- C=O	Chinon C=O	Keton [*] C=O
	meq/ g								
<i>C. coerulescens</i>	0,40	3,57	1,69	1,88	6,80	8,68	7,50	3,52	3,98
<i>A. alternata</i>	0,40	2,80	1,24	1,56	4,27	5,83	6,45	3,47	2,98
Tyrosin-Melanin	—	4,04	1,86	2,18	5,12	7,30	7,50	2,25	5,25
Dopa-Melanin	—	2,50	0,70	1,80	3,60	5,40	9,56	3,15	6,41
Catechol-Melanin	—	2,72	1,39	1,33	6,43	7,76	7,65	2,94	4,71

^{*} wurde berechnet

Auf Grund der Accessibilität (Philipp und Reinisch, 1976) muß davon ausgegangen werden, daß nicht jede erfaßte funktionelle Gruppe in situ eine wirksame Reaktionsstelle darstellt. Viel eher muß damit gerechnet werden, daß durch die Komplexität und das hohe Molekulargewicht der Melanine ein unterschiedlicher Grad der Zugänglichkeit besteht.

Der in Form der funktionellen Gruppen gebundene Sauerstoff wurde in Bezug zum Gesamtsauerstoff gesetzt (Tab. 5). Dabei stellte sich heraus, daß 78-99% des Sauerstoffes in Form der ermittelten funktionellen Gruppen gebunden vorliegt. Auf Grund dieses Ergebnisses muß davon ausgegangen werden, daß nur wenig Etherbrücken im Polymer vorhanden sind. Bei den aus *C. coerulescens* und *A. alternata* isolierten Farbstoffen zeigt sich, daß die Zugänglichkeit nicht allzu sehr behindert ist. Daher können diese Ergebnisse als Grundlage für weitere Schlußfolgerungen genommen werden.

Tab. 5: Auflistung des in Form von funktionellen Gruppen gebundenen Sauerstoffes.

	Sauerstoffanteil der einzelnen funktionellen Gruppen					
	COOH	phenolische OH	aliphatische OH	C=O	OCH ₃	Σ
<i>C. coerulescens</i>	0,15	0,08	0,31	0,34	0,02	0,90
<i>A. alternata</i>	0,16	0,10	0,28	0,42	0,03	0,99
Tyrosin-Melanin	0,17	0,09	0,23	0,34	—	0,83
Dopa-Melanin	0,07	0,09	0,17	0,45	—	0,78
Catechol-Melanin	0,13	0,06	0,31	0,36	—	0,86

6.2.4. Charakterisierung der proteinartigen Komponente

Der relativ hohe Verlust an Stickstoff durch Hydrolyse (Tab. 2) zeigt das Vorhandensein einer proteinartigen Komponente im Polymer an. Zur genauen Abklärung wurden Aminosäuren-Analysen der Hydrolysate vorgenommen. Die Tab. 6 gibt die Aminosäurezusammensetzung der proteinartigen Komponente von *C. coerulescens* und *A. alternata* wieder. Die für Proteine typischen Aminosäuren sind in den Hydrolysaten in ganzzahligen Vielfachen und in einer fast identischen Qualität und Quantität vorhanden. Eine Ausnahme stellen allerdings die Aminosäuren Prolin und Methionin dar. In beiden Fällen ist ein um den Faktor 2 erhöhtes Auftreten in der proteinartigen Komponente von *C. coerulescens* (Prolin) und in jener von *A. alternata* (Methionin) zu beobachten. Rechnerisch ergibt sich ein Molekulargewicht der proteinartigen Komponente von 13250 (*C. coerulescens*) und 14420 (*A. alternata*). Das Verhältnis von proteinartiger Komponente liegt bei ungefähr 0,1 mg/mg Polymer. An Hand des Aminosäuren-Gehaltes kann ein Anteil von 12 bzw. 10% proteinartigen Materials kalkuliert werden (Tab. 8).

Tab. 6: Aminosäurezusammensetzung der proteinartigen Komponente

AS	C. coerulescens			A. alternata		
	µg AS/ mg Pigment	nmol AS/ mg Pigment	Anzahl	µg AS/ mg Pigment	nmol AS/ mg Pigment	Anzahl
Asp	10,65	92,66	10	10,48	91,15	13
Thr	4,36	43,13	5	3,93	38,84	6
Ser	4,30	49,41	6	4,01	46,10	7
Glu	18,78	146,54	16	17,09	133,37	18
Pro	16,32	106,06	11	3,50	36,00	5
Gly	5,44	95,28	10	5,41	94,81	13
Ala	7,55	106,28	12	6,57	92,48	13
Val	6,93	69,90	8	6,63	66,84	9
Met	1,63	12,40	2	3,96	30,21	4
Ile	6,70	59,23	7	5,28	46,68	7
Leu	12,21	107,92	12	10,59	93,60	13
Tyr	4,73	29,00	5	4,63	28,39	4
Phe	7,42	50,43	6	6,92	47,00	7
His	10,51	76,66	8	8,76	63,89	9
Lys	2,59	28,07	3	3,21	25,06	4
Arg	1,41	9,05	1	1,17	7,47	1
Σ	121,53	1081,93	122	102,14	941,89	133

Mit Hilfe der Elektrophorese gelang die Abtrennung der proteinartigen Komponente vom Pigment. Demzufolge darf angenommen werden, daß zumindest ein Teil der proteinartigen Komponente über Wasserstoffbrückenbindung mit dem Pigment verbunden ist. Weiterhin wurde sowohl die abgetrennte proteinartige Fraktion von C. coerulescens als auch von A. alternata einer Zuckeranalyse unterworfen. Die proteinartigen Komponenten beinhalten nur Spuren von Zuckern. Im Hydrolysat wurden weniger als 0,1% Glucose (C. coerulescens) und 0,2% Glucose (A. alternata) sowie Mannose in minimalen Konzentrationen gefunden.

6.2.5. Zuckerbestimmung

Weitere, mit dem Pigment assoziierte, Komponenten sind Kohlenhydrate. Nach verschiedenen Hydrolysebedingungen wurden die Hexosen Mannose, Galactose und Glucose sowie die Pentose Xylose im Hydrolysat gefunden. In Tab. 7 sind die ermittelten Zuckerwerte dargestellt. Die qualitative Zusammensetzung der Zucker ist bei beiden untersuchten Polymeren gleich. Quantitativ ergeben sich deutliche Unterschiede bei den Zuckern Mannose und Galactose. Der Kohlenhydratgehalt liegt im Melanin von *C. coerulescens* bei 13,4% und bei *A. alternata* bei 11,5%.

Tab. 7: Zuckerzusammensetzung der Hydrolysate der Polymere von *C. coerulescens* und *A. alternata*.

Zucker-anhydrid	C. coerulescens			A. alternata		
	% im Pigment	nmol/mg Pigment	Anzahl	% im Pigment	nmol/mg Pigment	Anzahl
Mannose	5,6	0,35	7	1,4	0,09	2
Galactose	1,5	0,09	2	4,1	0,25	6
Glucose	5,6	0,35	7	5,5	0,34	9
Xylose	0,7	0,05	1	0,5	0,04	1
Total	13,4	0,84	17	11,5	0,72	18

Die Uronsäurebestimmung erfolgte in einem separaten Versuch. Da bekannt ist, daß uronsäurehaltige Polysaccharide gegenüber sauren Hydrolysen sehr widerstandsfähig sind (Adams, 1965) wurden verschiedene Hydrolysebedingungen angewandt. Bei *A. alternata* konnten unter keinen Bedingungen Uronsäuren nachgewiesen werden, während bei *C. coerulescens* nach der intensiven Hydrolyse bei 107°C weniger als 0,1% Galacturonsäure gefunden wurde.

6.2.6. Bilanz der elementaren Zusammensetzung der Polymere

Mit den Pigmenten von *C. coerulescens* und *A. alternata* sind Kohlenhydrate und "Proteine" assoziiert. Diese gefundenen und identifizierten Komponenten geben nicht die Gesamtsubstanz, die die Säurehydrolyse ergab, wieder (vgl. nicht identifizierbarer Rest Tab. 8). Die proteinartige Komponente und der Kohlenhydratanteil machen zusammen bei *C. coerulescens* 25,6% und bei *A. alternata* 21,66% des Gesamtpigmentes aus. Der nicht identifizierte Rest beträgt bei *C. coerulescens* 26,57% bei *A. alternata* 28,85%. Die theoretisch ermittelten CHNO-Werte für die nicht identifizierten Reste der untersuchten Bläupilze differieren stark untereinander im Kohlenstoff- und Stickstoffwert. Der Kohlenstoffwert ist bei *A. alternata* um das 1,7fache gegenüber *C. coerulescens* höher, während bei *C. coerulescens* der Stickstoffwert um das 4,7fache höher ist. Die Werte für Wasserstoff und Sauerstoff sind auf fast gleichem Niveau. In Tab. 8 ist die Bilanz wiedergegeben.

Tab. 8: Bilanz der elementaren Zusammensetzung der Polymere von *C. coerulescens* und *A. alternata*.

	C. coerulescens					A. alternata				
	%	C	H	N	O	%	C	H	N	O
	%					%				
Pigment	100,00	46,64	7,08	8,38	37,90	100,00	55,60	7,90	3,65	32,85
Kohlenhydrate	13,35	5,94	0,82	-	6,59	11,45	5,09	0,71	-	5,65
Proteinartige Komponente	12,25	6,37	0,98	1,96	2,94	10,21	5,31	0,82	1,63	2,45
Differenz	74,40	34,33	5,28	6,42	28,37	78,34	45,20	6,37	2,02	24,75
Verbleibender Rest nach der Hydrolyse	47,83	26,28	3,38	1,17	17,00	49,49	31,92	4,60	0,90	12,07
Nicht identifizierter Rest	26,57	8,05	1,90	5,25	11,37	28,85	13,28	1,77	1,12	12,68

6.3. Charakterisierung und Identifizierung der Spaltprodukte nach der Alkalifusion und Permanganat-oxidation.

Für melaninartige Pigmente gibt es bisher keinen spezifischen Nachweis. Substanzen, die der Melanindefinition von Nicolaus (1968) entsprechen, werden auf Grund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften in die Gruppe der Melanine eingeordnet. Zur genauen Identifizierung und Klassifizierung sollten aber nach Nicolaus et al. (1964) Abbauprodukte herangezogen werden. Auf der Basis von Abbaustudien wurde von Nicolaus (1968) eine weitere willkürliche Klassifizierung der Melaninpigmente vorgenommen.

Allomelanine, werden durch Oxidation von Diphenolen wie z.B. Catechol gebildet (Swan, 1974) und gehören somit laut Definition von Nicolaus (1968) zu den "Nicht-Indol-Typ"-Melaninen. Bei Eumelaninen handelt es sich, da sie durch enzymatische Oxidation von Tyrosin entstehen um "Indol-Typ"-Melanine. In diese Klasse gehören auch die braun, rot oder gelb gefärbten Phäomelanine.

Ob eine Einordnung der aus *C. coerulescens* und *A. alternata* extrahierten Melanine in eine der genannten Gruppen möglich ist, sollte an Hand von Abbauprodukten nach Alkalifusion und Permanganatoxidation mittels chromatographischen Methoden abgeklärt werden.

6.3.1. Dünnschichtchromatographie

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie konnten die Etherextrakte nach der ALKALIFUSION gut und reproduzierbar aufgetrennt werden. Als Vergleichssubstanzen wurden die nach der Alkalifusion bei Melaninen (Hackmann und Goldberg, 1971) und Huminsäuren (Haworth, 1971) bekannten Abbauprodukte 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Resorcinol, Orcinol und Phloroglucinol eingesetzt. Auf Grund des R_f -Wertes kann 3,4-Dihydroxybenzoesäure in den Etherextrakten der fünf untersuchten Melanine identifiziert werden. Der R_f -Werte für 3,4-Dihydroxybenzoesäure liegt bei Verwendung von (siehe 5.8.1.1.) Trennsystem I bei 0,77, von II bei 0,86 und von III bei 0,82. Die Identifizierung erfolgt im UV-Licht. Durch Besprühen mit 3%iger ethanolischer $FeCl_3$ -Lösung oder Folin-Reagenz kommt es zu einer dunkelblauen Färbung.

Parallel dazu wurde ein Reagenzglasversuch vorgenommen. Die entsprechenden wassergelösten Etherextrakte tropfenweise mit Ehrlich's Reagenz versetzt, ergeben bei allen fünf untersuchten Proben eine positive Reaktion. Doch zeigen die Proben der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* sowie Tyrosin- und Dopa-Melanin eine zarte Gelbfärbung, während der Etherextrakt von Catechol-Melanin sich mit Ehrlich's Reagenz orange-rot färbt.

Die Etherextrakte nach der PERMANGANATOXIDATION konnten ebenfalls chromatographisch getrennt werden. Mit Hilfe der Fluoreszenz können bei *C. coerulescens*, *A. alternata*, Tyrosin- und Dopa-Melanin zwei Substanzflecken (R_f 0,71 und 0,60), beim Catechol-Melanin nur ein Substanzfleck (R_f 0,71) detektiert werden. Anfärbungsversuche mit 3%iger ethanolischer $FeCl_3$ -Lösung, Folin- und Ehrlich's Reagenz sollten auf eine zugehörige Stoffklasse deuten, doch ermöglichten sie keine eindeutige Klassifizierung.

6.3.2. HPLC

Die beste Trennung der Produkte nach der ALKALIFUSION wurde mit einem Säulenmaterial RP-18 (Merck), einem Fließmittelsystem aus Methanol:Wasser (60:40) und einer Durchflußrate von 0,6 ml/min bei 254 nm erhalten.

Die Trennungsdiagramme der Etherextrakte nach der Alkalifusion sind in Abb. 36 dargestellt. Auf Grund der Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie (6.3.1.) wurde das Vorhandensein der 3,4-Dihydroxybenzoesäure diskutiert. Mit Hilfe der Cochromatographie in der HPLC sollte diesem Verdacht nachgegangen werden. Wie die Trennungsdiagramme zeigen, konnte 3,4-Dihydroxybenzoesäure bei allen fünf untersuchten Melaninen als Spaltprodukt detektiert werden. Auffallend ist, daß die Vergleichssubstanz, alleine in die HPLC-Apparatur eingespritzt, eine Retentionszeit von 143 sec hat. In den Etherextrakten der einzelnen Melanine verlängert sich, bis auf Catechol-Melanin (143 sec), die Retentionszeit um 61 sec bei *C. coerulescens* und *A. alternata* und um 20 sec beim Tyrosin-Melanin bzw. 53 sec beim Dopa-Melanin. Da der Etherextrakt des Catechol-Melanins als einzige Probe nur ein Signal aufweist, werden Wechselwirkungen der Abbauprodukte untereinander vermutet, die dann die Retentionszeit verlängern.

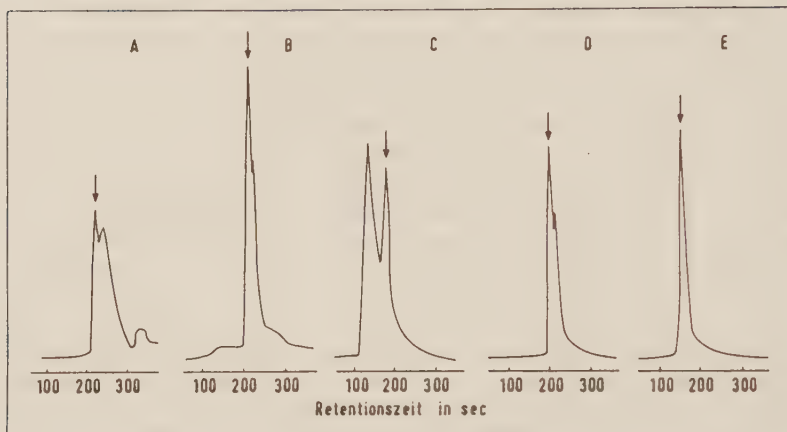


Abb. 36: HPLC-Trennungsdiagramm der Etherextrakte nach der Alkalifusion. A: *C. coerulescens*, B: *A. alternata*, C: Tyrosin-Melanin, D: Dopa-Melanin, E: Catechol-Melanin. Der Pfeil kennzeichnet die 3,4-Dihydroxybenzoesäure.

Eine optimale Trennung der Produkte nach der PERMANGANAT-OXIDATION wurde mit Hilfe einer RP-18 250 Säule (Merck), einem Eluens aus Methanol:Wasser (60:40) und einer Durchflußrate von 0,6 ml/min bei 190 nm erzielt. Die Trennungsdiagramme sind in Abb. 37 dargestellt. Im Etherextrakt der Melanine von *C. coerulescens*, *A. alternata* und beim Dopa-Melanin sind drei Signale feststellbar. Tyrosin-Melanin zeigt zwei, während Catechol-Melanin nur einen Peak aufweist.

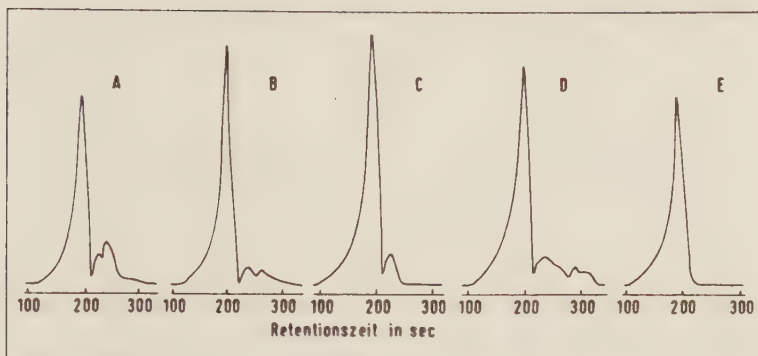


Abb. 37: HPLC-Trennungsdiagramme der Etherextrakte nach der Permanganatoxidation. A: *C. coerulescens*, B: *A. alternata*, C: Tyrosin-Melanin, D: Dopa-Melanin, E: Catechol-Melanin.

6.4. Charakterisierung des Acetonextraktes

6.4.1. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Mit Aceton konnten aus sieben Tage altem Myzel von *C. coerulescens* als auch von *A. alternata* mehrere Komponenten extrahiert werden. Mit Hilfe der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie erhält man folgendes Auftrennungsbild (Abb. 38). Die Identifikation im kurzwelligen UV-Licht ergibt bei *C. coerulescens* acht, bei *A. alternata* zehn Substanzflecken. Auf Grund des Vorhandenseins von einem Substanzflecken mit identischem R_f -Wert wurde vermutet, daß es sich dabei um die gleiche Komponente handelt (Pfeil). Im langwelligen UV-Licht können bei *C. coerulescens* sieben und bei *A. alternata* sechs Substanzflecken registriert werden. Auch hier ergibt sich auf Grund des gleichen Laufverhaltens einer Komponente ein identischer R_f -Wert (Pfeil). Zur genaueren Analyse der Chromatogramme wurden Sprühreagenzien verwendet, die das Vorhandensein von Phenolen und Anthrachinonen andeuten.

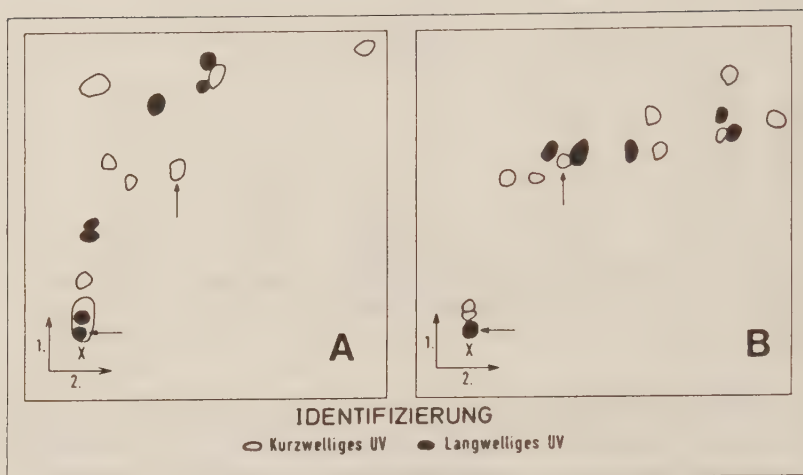


Abb. 38: Zweidimensionale Dünnschichtchromatogramme der Acetonextrakte von A: *C. coerulescens* und B: *A. alternata*.

6.5. Künstliche Infizierung und Imprägnierung von Kiefern-splintholzklötzchen

Die künstlich mit *C. coerulescens* bzw. *A. alternata* infizierten Kiefern-splintholzstückchen zeigten nach drei Wochen die ersten dunklen Verfärbungserscheinungen (Abb. 39). Eine genaue Untersuchung der Holzstückchen ergab auch bei Lupenvergrößerung keine Infektion mit anderen Pilzen. Die Kontrollstückchen waren pilzfrei.

Die Ergebnisse der Imprägnierungsversuche sind in (Abb. 40) dargestellt. Kiefern-splintholzklötzchen können mit den entsprechenden Melaninen imprägniert werden. Durch diese Imprägnation werden die Holzklötzchen dunkel gefärbt. Die Verfärbung zeigt alle Farbnuancen von graublau bis schwarz und ist konzentrationsabhängig. An Stellen, wo sich das imprägnierte Melanin akkumuliert, wird das Holz schwarzgefärbt.

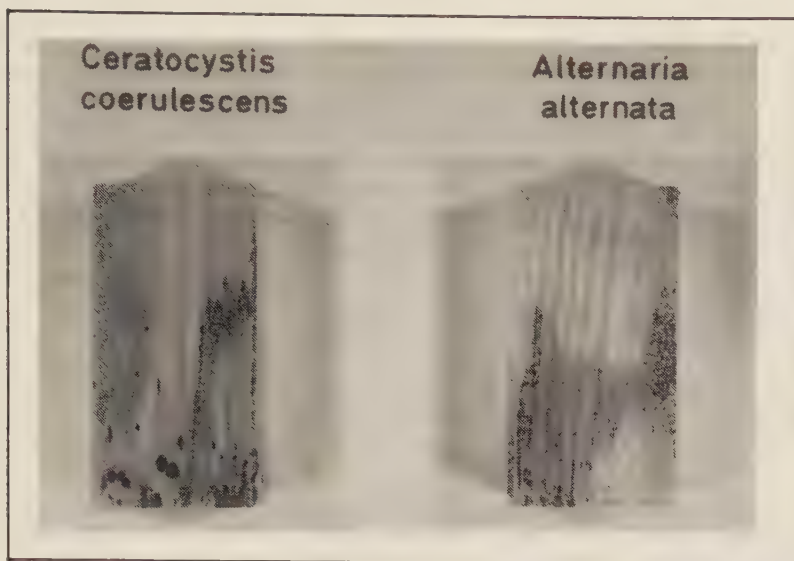


Abb. 39: Künstlich mit *C. coeruleus* (A) und *A. alternata* (B) infizierte Kiefernplinthholzstückchen.

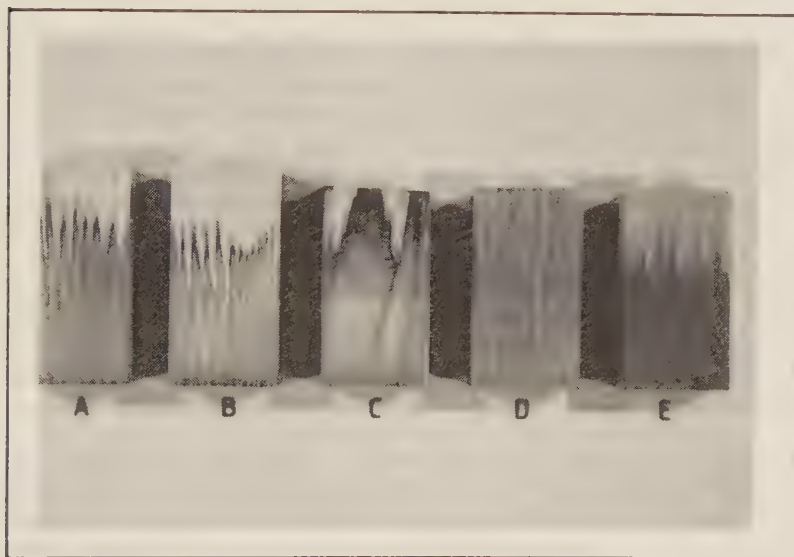


Abb. 40: Kiefernplinthholzklötzchen mit Melaninen von A: *C. coeruleus* und B: *A. alternata* sowie C: Tyrosin-Melanin, D: Dopa-Melanin und E: Catechol-Melanin imprägniert.

7. DISKUSSION

Die aus den Bläuepilzen *C. coerulescens* und *A. alternata* isolierten Pigmente wurden als Melanine erkannt. Melanine sind keine einheitlichen, im Sinne der klassischen Chemie definierten Verbindungen. Die Struktur der Melanine ist weitgehend unbekannt, ihre Zuordnung erfolgt per definitionem nach Nicolaus (1968). Hiernach werden Substanzen die schwarz und unlöslich in den meisten Lösungsmitteln sind, die durch H_2O_2 entfärbt werden und die fähig sind $AgNO_3$ zu reduzieren als Melanine bezeichnet. Diese schwarz-braunen Pigmente kommen beim Menschen, im Tierreich, bei Pflanzen und Mikroorganismen vor. Viele Pilze, Ascomyceten, Fungi imperfecti und Basidiomyceten haben Melanineinlagerungen.

Über die Funktion der Melanine gibt es verschiedene Theorien. Nach Bell und Wheeler (1986) sind diese Pigmente nicht lebensnotwendig, doch steigern sie die Überlebens- und Konkurrenzfähigkeit der Spezies. Dies belegen frühere Arbeiten von Lockwood (1960), Linderman und Toussoun (1966), Potgieter und Alexander (1966), Bloomfield und Alexander (1967), Bull (1970), die den Zusammenhang zwischen Melaninvorkommen in Pilzen und der Resistenzerrhöhung gegen mikrobielle Lysis nachwiesen. Nach Zhdanova und Pokhodenko (1973) schützen Melanine Pilzzellen vor dem Austrocknen bei ungünstigen Witterungsbedingungen. Dunkle Pigmente sollen zudem einen Schutz vor ionisierender Strahlung darstellen (Durrell, 1964). Sealy (1980) führte dies auf das Vorhandensein freier Radikale in Melaninen zurück. Seiner Meinung nach sollen diese freien Radikale dann als Radikalfänger den durch Sonnenstrahlung im Hautgewebe gebildeten schädlichen Radikalen entgegenwirken. Welche Funktion Melanine in Bläuepilzen haben, ist noch nicht erforscht. Vorstellbar ist, daß Melanine auch für Bläuepilze einen gewissen Schutz vor dem Austrocknen darstellen.

Die Zuordnung der Pigmente von *C. coerulescens* und *A. alternata* erfolgte nicht nur auf Grund der Übereinstimmung ihrer Eigenschaften mit den von Nicolaus (1968) geforderten Punkten, den im Diagnostik-Test für Melanine zusammengefaßten Faktoren und den mikroskopischen Erkenntnissen, sondern auch durch chemisch-analytische Verfahren.

Durch MIKROSKOPISCHE VERFAHREN konnte die Zellwand als Ort der Pigmenteinlagerung identifiziert werden.

An Hand von Entwicklungsverlaufsstudien konnte im LICHT-MIKROSKOP festgestellt werden, daß die Synthese des Pigmentes altersabhängig ist. Erst mit zunehmendem Alter, einhergehend mit der Endokonidien- bzw. Chlamydosporenbildung, färben sich die Hyphen der untersuchten Bläuepilze dunkel. Da die Pigmentbildung altersabhängig ist, besteht ein Interesse, die an der Pigmentbiosynthese beteiligten Enzyme zu kennen. Das aus dem Tierreich bekannte Schlüsselenzym für die Melaninsynthese ist die Tyrosinase (Phenol-oxidase) (Fitzpatrick et al., 1981; Pawelek und Korner, 1982; Wolman, 1969). Eine Tyrosinaseaktivität wurde 1965 von Luthard und Lyr in holzerstörenden Pilzen nachgewiesen. Viele Pilze bilden Tyrosinase abhängig vom Entwicklungsstadium, dabei sind drei Bildungstypen zu unterscheiden: 1. ständige Bildung von Tyrosinase, 2. Tyrosinase ist nur im jugendlichen Myzel, oft nur in der Wachstumszone vorhanden und 3. Tyrosinase tritt in aktiver Form erst im alternden Myzel oder beim Übergang zur Fruchtkörperbildung auf. Die Art der Bildungsweise ist offenbar genetisch verankert. Offen bleibt, ob es im entsprechenden Myzel zu einer de-novo-Synthese von Tyrosinase bzw. deren Aktivierung oder Inhibitorhemmung kommt.

Die Anwesenheit von Tyrosinase und Ergebnisse aus UV- und IR-Spektroskopie sowie chemische Analysen gaben oft zu der Vermutung Anlaß, daß die untersuchten Pilz-Melanine Dopa-Melanine seien (Bell und Wheeler, 1986). Doch häufig konnten weder Tyrosin noch Tyrosinase am Melaninsynthesort (äußere Zellwand) nachgewiesen werden. Durch Experimente von Simon et al. (1979) wurde gezeigt, daß Laccase das für die Oxidation von Dopa in der äußeren Zellwand von Pilzen verantwortliche Enzym ist. Da Laccase kein Tyrosin oxidieren kann, muß bei Pilz-Melaninen ein anderes Substrat angenommen werden. Viele Pilz-Melanine sind DHN-Melanine, gebildet über den Pentaketidweg aus 1,8-Dihydroxynaphtalin (DHN) (Siehr, 1981; Wheeler et al., 1978, Woloshuk et al., 1983). Laccase, das bei vielen Pilzen für die DHN-Melaninsynthese verantwortliche Enzym wurde 1967 von Berndt und 1969 von Rösch et al. in Bläuepilzen nachgewiesen. Wie bei Tyrosinase kann bei Laccase auch von drei Bildungstypen ausgegangen werden (Schanel, 1962; Lyr, 1964).

Im RASTER-ELEKTRONENMIKROSKOP wurde festgestellt, daß die Außenstruktur junger Hyphen von beiden untersuchten Bläuepilzen glatt ist, während ältere Hyphen zum Teil von warzigen Auswüchsen umgeben sind. Ähnliche Oberflächenunebenheiten wurden schon 1965 von Schmid und Liese bei Bläuepilzen beschrieben. Die Autoren führten diese Strukturen auf Abdrücke von Protoplasmabestandteilen oder auf den Holzuntergrund zurück. Letzteres muß als Grund für die Oberflächenunebenheiten bei *C. coerulescens* und *A. alternata* ausgeschlossen werden, da beide Pilze in Flüssigkultur gezüchtet wurden. Die rauhe und zum Teil warzige Oberflächenstruktur bei den untersuchten, meist sieben Tage alten Hyphen der Bläuepilze könnte auf Protoplasmabestandteile oder auf die 1965 von Schmid und Baldermann beschriebene Schleimhülle zurückzuführen sein. Diese Schleimhülle soll aus einem Polysaccharid (α -Glucan) bestehen. Im Elektronenmikroskop wurden mit Hilfe der Thorotrast-Methode saure Mucopolysaccharide in dem extrazellulären Material der untersuchten Pilze sowie in der Zellwand von *Daedalea* nachgewiesen (Bender et al., 1959; Schmid und Baldermann, 1967).

Zum weiteren kann die Oberflächenstrukturierung der untersuchten Bläuepilze auch im Zusammenhang mit den gesuchten Pigmenten diskutiert werden. Von Ellis und Griffiths (1975) wurde an *Phomopsis* Melanineinlagerungen in Form von schleimigen, unregelmäßig auf der Hyphenoberfläche angeordneten Auswüchsen beschrieben. Zusätzlich zu diesen Erkenntnissen aus der Raster-Elektronenmikroskopie zeigten die gleichen Präparate im Transmissions-Elektronenmikroskop granuläre Einlagerungen von Melanin in der Zellwand. Untersuchungen von Wheeler et al. (1976) führten durch Versuche mit Wildtyp-Stämmen und Mutanten von *Verticillium dahliae* zu dem Ergebnis, daß sowohl granuläre Einlagerungen in der Zellwand als auch die rauhe Hyphenoberfläche mit Melaninen zusammenhängen. Durch Zugabe von (+)-Scytalon kam es bei ihren untersuchten Albinomutanten in Korrelation mit der Dunkelpigmentierung zu einer rauhen Strukturierung der Hyphenoberfläche und zu granulären Einlagerungen von Melanin in der Zellwand.

TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE STUDIEN zeigten, daß in älterem, dunkelpigmentierten Myzel von *C. coerulescens* und *A. alternata*, hochkontrastierte Granulae im Cytoplasma gehäuft auftreten und daß diese Granulae in die Zellwand eingelagert werden. Nach Bell und Wheeler (1986) beweisen

drei Punkte, daß es sich bei elektronendichtem Material in der Zellwand von Pilzen um Melanine handelt. 1. nur melanisierten Hyphen haben elektronendichte Granulae in der Zellwand; hyaline Hyphen dagegen sind elektronendurchlässig (Wheeler et al., 1976, 1978; Wheeler und Stipanovic, 1979). 2. Zellwände die bei Wildtyp-Stämmen Melanineinlagerungen haben und somit elektronendicht sind, sind bei den entsprechenden Albino-Mutanten elektronendurchlässig. Durch Zugabe von Melaninvorstufen zu Albino-Mutanten können elektronendichte Einlagerungen in der Zellwand hervorgerufen werden (Geis et al., 1984; Wheeler und Spipanovic, 1979). 3. in nicht toxischen Konzentrationen verhindert der Melaninsynthesehemmer Tricylazole weitgehend die Bildung von elektronendichten Granulae in der Zellwand von Chlamydosporen.

Sowohl bei *C. coerulescens* als auch bei *A. alternata* konnte festgestellt werden, daß sehr junge, noch nicht ausdifferenzierte Hyphen keine hochkontrastierten elektronendichten Granulae in der Zellwand und im Cytoplasma haben. Bei den im Laufe der Anzüchtungsversuche immer wieder auftretenden "Albino-Mutanten" konnten keine hochkontrastierten Granulae im Cytoplasma und in der Zellwand gefunden werden, außerdem ist die Zellwand fast um die Hälfte dünner. In Übereinstimmung mit den Erkenntnis von Bell und Wheeler (1986) sowie den durchgeführten chemisch-analytischen Untersuchungen kann es sich bei den hochkontrastierten Granulae im Cytoplasma und in der Zellwand bei beiden Bläuepilzen nur um Melanineinlagerungen handeln.

Ob die granulären Cytoplasmastrukturen den bei Tieren gefundenen Prämelanosomen gleichen, kann nicht beantwortet werden. In der Literatur (Hegnauer et al., 1985; Kozlova und Lyakh, 1981; Pechak und Crang, 1979) werden granuläre Cytoplasmastrukturen bei Pilzen im Zusammenhang mit der Pigmentierung durch Melanine immer wieder diskutiert. Einen Beweis für die Beteiligung der im Cytoplasma gefundenen granulären Strukturen an der Melaninbiosynthese gibt es bis jetzt noch nicht. Es besteht aber die Vermutung, daß die granulären Cytoplasmastrukturen Vorstufen der in der Zellwand deponierten Melanine sind. Nach Meinung von Griffiths (1982) sowie Bunning und Griffiths (1984) müßten diese sogenannten Vorstufen in der Zellwand zum eigentlichen Melanin oxidiert und eingelagert werden. Im Gegensatz zu den bei Actinomyceten, Bakterien und bei für Menschen pathogenen Pilzen extracellulären Melaninen (Bell und Wheeler, 1986) sind die Melanine von *C. coerulescens*

und *A. alternata* in die Zellwand eingelagert, d.h. zellwandgebunden.

CHEMISCH-ANALYTISCHE UNTERSUCHUNGEN wurden an allen fünf zur Verfügung stehenden Melaninen vorgenommen.

Die UV/VIS-SPEKTREN zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf. Der mehr oder minder gleichförmige Abfall der Absorption mit zunehmender Wellenlänge ist ein typisches, wenngleich zur Strukturaufklärung wenig informatives Kennzeichen von Melaninen. Aus der Literatur (Filip et al., 1976; Schnitzer, 1971; Ziechmann, 1980) ist bekannt, daß bei Melaninen, melaninähnlichen Stoffen und Huminsäuren dieser Kurvenverlauf charakteristisch ist. Die Autoren (Ellis und Griffiths, 1974, 1975) gehen sogar soweit, daß sie die negativen Gradienten, erhalten durch log Absorption gegen die Wellenlänge (400 bis 600 nm) als Charakteristikum für Melanine in ihrem Diagnostik-Test aufnehmen. Von Flaig und Salfeld (1958) ist bekannt, daß sie UV-Spektren von Huminstoffen im Hinblick auf substituierte o- und p-Benzochinon-Strukturen interpretieren. In ihrer Arbeit führten Kasatochkin et al. (1964) die Neigung der Extinktions-Kurven von Huminstoffen auf die unterschiedliche Beweglichkeit von π -Elektronen in aromatischen Kernen und anderen ungesättigten Strukturen zurück. Die Abhängigkeit der Lichtabsorption wurde auch im Hinblick auf den Grad der Kondensation aromatischer Kerne und in Abhängigkeit von der Teilchenmasse (Kleist und Mücke, 1966) diskutiert.

Die INFRAROT-SPEKTREN der Melanine der untersuchten Bläuepilze zeigen vorwiegend Banden, die von aliphatischen Strukturelementen herrühren. Weitere Banden sind, vor Hydrolyse der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata*, Amidbanden I und II. Nach Hydrolyse sind diese Banden nicht mehr erkennbar oder nur noch im Ansatz vorhanden. Ähnliche IR-Spektren sind in der Literatur (Filip et al., 1974; Russell et al., 1980) beschrieben. Die Autoren gehen davon aus, daß es sich bei den Melaninen ihrer untersuchten Pilze um Melanoproteine handelt. Sie definieren Melanoprotein als Assoziation von Melanin mit Protein. Wenn man von dieser Definition ausgeht, so kann man die Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* ungeachtet der Herkunft des Proteins auch als Melanoproteine betrachten. Andererseits könnte das Protein durch die Extraktionsmethode bedingt aus der Zellwand gelöst werden und wäre

somit nicht untrennbar mit dem ebenfalls extrahierten Melanin verbunden. Diesem Gedanken widerspricht aber die reproduzierbare Menge von ca. 0,1 mg "Protein" pro mg Polymer.

Neben dieser hydrolytischen Abspaltung von "Protein" wurden zusätzlich Kohlenhydrate abgespalten. Die Grundstruktur der Polymere bleibt von der Hydrolyse unbeeinflusst und zeigt einen vorwiegend aliphatischen Aufbau. Bei den Melaninen von *C. coerulescens* und *A. alternata* handelt es sich um komplexe Polymere in denen aliphatische Strukturelemente über Aromaten dominieren und die mit Eiweißsubstanzen sowie Kohlenhydraten assoziiert sind.

Aus einem Vergleich der FTIR-Spektren der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* nach Hydrolyse ergibt sich, daß die Grundstruktur bei beiden Polymeren annähernd gleich ist. Eine Aussage darüber, welches Melanin aus mehr aliphatischen Elementen aufgebaut ist, kann auf Grund der IR-Spektren nicht gemacht werden.

Die Ergebnisse der IR-Spektren der fünf untersuchten Melanine wurden gegeneinander abgewogen. Dabei ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den IR-Spektren der Vergleichsmelanine untereinander und im Vergleich mit den Melaninen von *C. coerulescens* und *A. alternata*. Der markante Unterschied zwischen den Vergleichsmelaninen und den Melaninen von *C. coerulescens* und *A. alternata* sind die Banden bei 2920 und 2850 cm^{-1} , die den aliphatischen CH-Streckschwingungen zugeordnet werden. Beide Banden sind bei den Vergleichsmelaninen nicht oder nur ganz schwach im Ansatz vorhanden. Dies spricht für einen weniger aliphatischen Aufbau von Tyrosin-, Dopa- und Catechol-Melanin und damit für mehr aromatische Gruppen bei den Vergleichssubstanzen, als bei den Melaninen von *C. coerulescens* und *A. alternata*. Ansonsten muß davon ausgegangen werden, daß alle analysierten Melanine aus den gleichen funktionellen Gruppen zusammengesetzt sind.

Die chemische Modifizierung der Melanine brachte keinen deutlichen Unterschied zwischen den untersuchten Proben zu Tage. Die Reduktion durch NaBH_4 führt zu einer intensiveren Absorptionsbande der $\text{C}-\text{CH}_3$ -Gruppe. Die Bande bei 1640 cm^{-1} verliert an Intensität. Nach Kirk et al. (1975) soll dies der Beweis für die Existenz einer reduzierbaren Carbonylgruppe sein. Die OH-Bande bei 3440 cm^{-1} bleibt von der Reduktion unbeeinflusst und könnte nach Colthup et al. (1964) von Carboxyl-OH-Streckschwingungen herrühren. Durch

die Acetylierung kommt es zu einer detaillierteren Aufspaltung des "finger-print"-Bereiches bei allen Proben.

KERNRESONANZ-SPEKTREN wurden zur Strukturaufklärung der Melanine der untersuchten Bläuepilze herangezogen.

Die ^1H -NMR-SPEKTREN zeigen die nahezu identische Zusammensetzung der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata*. Die dominant vorkommenden Signale sind aliphatischer Herkunft. Durch Hydrolyse werden Eiweißsubstanzen und Kohlenhydrate vom Polymer abgespalten, außerdem fehlen Signale aromatischen Ursprungs, was jedoch nicht mit dem Fehlen dieser Stoffgruppe gleichzusetzen ist. Aromatische Ringe der Substanz können andere Substituenten als Wasserstoff haben und somit kein Signal verursachen. Ebenfalls vorstellbar wäre, daß freie Radikale, wie sie 1954 Commoner et al. und 1980 Sealy bei Melaninen nachgewiesen haben, die NMR-Bedingungen stören. Als Fazit ergibt sich, daß durch Hydrolyse die Grundstruktur der Melanine nicht verändert wird. Zusätzlich zeigt sich der vorwiegend aliphatische Aufbau der Polymere von *C. coerulescens* und *A. alternata*, wobei aromatische Strukturelemente schon auf Grund der Methode nicht ausgeschlossen werden dürfen. Zum weiteren konnten phenolische OH-Gruppen bei beiden Bläuepilzen bestimmt werden.

An Hand der ^{13}C -NMR-SPEKTREN zeigt sich der komplexe Aufbau der Polymere in Form von Peaks, Schultern und Plateaus in den Signalbereichen von aliphatischen-, Protein-, Polysaccharid-, aromatischen-, Carbonyl- und Carboxyl-Gruppen wieder. Da auch nach Hydrolyse immer noch "Proteinsignale" auftreten, muß davon ausgegangen werden, daß nicht alles Protein hydrolysierbar ist, sondern wie Haider et al. (1965, 1975) beschrieben, als nicht hydrolysierbares Protein gebunden an einen aromatischen (ev. phenolischen) Ring vorliegt. Die Signale in der sogenannten Polysaccharidregion (50-100 ppm) müssen nicht unbedingt auf Kohlenhydrate zurückzuführen sein, sondern können auch von Alkoholen, aliphatischen CH_3 -Gruppen und β -Kohlenstoff-Atomen, was nach Hydrolyse viel wahrscheinlicher ist, stammen. Mit einer chemischen Verschiebung der Signale um ± 5 -10 ppm gegenüber Reinsubstanzen muß auf Grund des hohen Molekulargewichtes und der Komplexität der Melanine gerechnet werden. Aus der Literatur (Gonzalez-Vila et al., 1978; Lüdemann et al., 1982) ist bekannt, daß es bei

Melaninen von Pilzen zu einer chemischen Verschiebung der Signale kommt. Die Gründe hierfür sind vielfältig und können zum einen in der Viskosität der Lösung und zum anderen im Vorhandensein von ^{13}C -Atomen mit ungepaarten Elektronen gesucht werden. Eine weitere Komplikation stellt die Accessibility, d.h. die Zugänglichkeit dar.

Ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von *C. coerulescens* und *A. alternata* mit den aus der Literatur bekannten Spektren macht den komplizierten und vielfältigen Aufbau der Melanine deutlich. Sowohl die Melanine von *Aspergillus niger*, *Stachybotrys chartarum*, *Eurotium echinulatum* (Gonzalez-Vila et al., 1978) als auch die von Lüdemann et al. (1982) untersuchten, aus Pilzen extrahierten, Melanine zeigten Signale im Aliphaten- und/oder Proteinbereich sowie in der Polysaccharid- und der Aromaten-Region, außerdem im Bereich von Carbonyl- und Carboxylgruppen. Weiterhin war den Spektren eine sehr hohe Untergrundschwingung gemeinsam.

Die aus den Bläuepilzen *C. coerulescens* und *A. alternata* extrahierten Melanine wurden mit Hilfe der MASSENSPEKTROSKOPIE untersucht. Vor Hydrolyse zeigen die Pyrolyse-Massenspektren beider Melanine Signale ungeradzahlgiger Komponenten. Viele Peaks stammen aus Proteinmaterial, doch sind die Spektren in ihrer Gesamtheit gegenüber reinen Proteinspektren, wie sie aus der Literatur (Posthumus et al., 1974) bekannt sind, verschieden. Vor allem die Signale bei $m/e = 67, 81$ und 122 sind charakteristisch für Melanine (Meuzelaar et al., 1977). Weitere Signale sind auf polysaccharidartiges Material zurückzuführen. Nach Hydrolyse verlieren die für Polysaccharide und Proteine stehenden Signale an Intensität. Das Signal $m/e = 70$ (Penten) und die für Aromaten stehenden Signale gewinnen an Intensität.

Bei den Massenspektren handelt es sich um sehr komplexe Mischungen von Pyrolysespaltprodukten. Obwohl die chemische Struktur der Einzelkomponenten nicht mit Sicherheit bestimmt werden kann zeigt sich, daß auch nach Hydrolyse immer noch Proteinmaterial mit den Melaninen der untersuchten Bläuepilze assoziiert ist. Es wird vermutet, daß die stickstoffhaltigen Fragmente im Pyrogramm der hydrolysierten Melanine von N-terminalen Aminosäuren der an den phenolischen Ring gebundenen Proteinkette herkommen (Saiz-Jimenez et al., 1975). Der Vergleich der Spektren von *C. coerulescens* und *A. alternata* zeigt eine auffallend qualitative Ähnlichkeit in der Zusammensetzung der Spalt-

produkte. Veröffentlichungen von Pyrogrammen von Melaninen (Haider et al., 1977; Meuzelaar et al., 1977) zeigten in Übereinstimmung mit den Spektren von *C. coerulescens* und *A. alternata* Signale für proteinartiges Material, für aromatische, phenolische und aliphatische Komponenten sowie für Polysaccharide. Aus diesen Befunden entwickelten Haider et al. (1975) das Konzept, daß Melanine komplexe phenolische-proteinartige Polymere sein sollen. Doch die Veröffentlichung von Saiz-Jimenez (1983) als auch die eigenen Untersuchungen zeigen den vorwiegend aliphatischen Aufbau der untersuchten Pilz-Melanine. Die Herkunft der Phenole führen Saiz-Jimenez et al. (1975) auf die Inkorporation von Phenolen und Anthrachinonen in die Melanine während ihrer Biosynthese zurück. Zahlreiche Dimethylphenole, Dihydroxytoluole, Resorcinol, Benzolderivate und polycyclische Komponenten wurden über Gaschromatographie in den Pyrolysaten des Melanins von *Eurotium echinulatum* gefunden (Saiz-Jimenez und Martin, 1975).

Die ELEMENTARANALYSE ergibt sowohl für das Melanin von *C. coerulescens* als auch *A. alternata* Werte, die im Rahmen der aus der Literatur bekannten CHN-Werte für Melanine liegen (Schnitzer et al., 1973; Saiz-Jimenez et al., 1975; Saiz-Jimenez, 1983). Durch Hydrolyse kommt es zu einem Stickstoffverlust von 70 bzw. 50 %.

Eine AMINOSÄUREN-ANALYSE der Hydrolysate beweist das Vorhandensein von proteinartigem Material im Melanin von *C. coerulescens* und *A. alternata*. Die für Proteine typischen Aminosäuren sind in den Hydrolysaten beider Melanine in Qualität und Quantität fast identisch vorhanden. Durch Elektrophorese kann ein Teil des "Proteins" vom eigentlichen Melanin abgetrennt werden. Es wird vermutet, daß zumindest dieser Teil über Wasserstoffbrücken mit dem Polymer verbunden ist.

Die Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* sind komplexe Polymere bei denen die aliphatische Struktur über die aromatischen Elemente dominiert. Die C/H-WERTE und die Ergebnisse aus den spektroskopischen Untersuchungen sprechen für diese Annahme. Nach van Krevelen (1950) müßten auf Grund des H/C-Verhältnisses sowohl bei *C. coerulescens* als auch bei *A. alternata* über die Hälfte der Kohlenstoff-Atome in aliphatischer Form gebunden vorliegen. Das reziproke Verhältnis und die Infrarot-Spektren zeigen

im Vergleich mit den analysierten Tyrosin-, Dopa- und Catechol-Melaninen, daß die Vergleichs-Melanine mehr aromatische Gruppen enthalten, als die Melanine der Bläuepilze.

Zur Untersuchung des chemischen Verhaltens der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* wurden die FUNKTIONELLEN GRUPPEN bestimmt. Auf Grund der Komplexität und der damit verbundenen mangelnden Accessibilität (z.B. sterische Hinderung) geben die gefundenen Werte aber nur einen Hinweis auf die Reaktionsfähigkeit der Melanine. 90 bzw. 99% des vorhandenen Sauerstoffes ist in Form der analysierten funktionellen Gruppen gebunden. Demzufolge kann es in den Polymeren von *C. coerulescens* und *A. alternata* kaum Etherbrücken geben.

Eine weitere wichtige Komponente der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* sind POLYSACCHARIDE. Die Zuckerzusammensetzung der Hydrolysate der Polymere ist qualitativ die gleiche, während quantitativ kleine Unterschiede auftreten. 1983 fand Saiz-Jimenez, daß das Melanin seines untersuchten Pilzes ebenfalls mit Polysacchariden assoziiert ist. Die Untersuchungen von Linhares und Martin (1979) ergaben für huminsäureartige Melanine aus Pilzen Kohlenhydratwerte von 1,1 bis 5,9%. Die bei *C. coerulescens* und *A. alternata* gefundenen Werte sind bedeutend höher und liegen bei 13,4 bzw. 11,5 %. Dieser Unterschied kann zum einen an den untersuchten Spezies liegen und zum anderen auf die unterschiedlichen Hydrolysebedingungen zurückführbar sein. Ungeklärt ist, ob die Polysaccharide chemisch gebunden vorliegen, oder ob sie ein Extraktionsartefakt darstellen. Vorstellbar wäre, daß Zellwandmaterial durch die Alkaliextraktion mit abgelöst wird und auf diesem Weg mit den extrahierten Melaninen zusammenkommt und mitanalysiert wird. Aus Veröffentlichungen von huminsäureartigem Material (Gonzalez-Vila et al., 1976; Hatcher et al., 1980a, 1980b, 1981) ist dieses Problem ebenfalls bekannt. Manche Autoren neigen zu der Auffassung, daß es sich bei den Kohlenhydratanteilen um Copräzipitate handelt (Barker et al., 1967; Flaig et al., 1975). Demgegenüber stehen oft Ergebnisse aus der IR-Spektroskopie, die zeigen, daß der Kohlenhydratteil über Esterbrücken oder über Aminosucker an das Polymer gebunden ist. Der Kohlenhydratteil würde somit eine strukturelle Einheit des Polymers darstellen (Filip et al., 1974; Clark und Tan, 1969; Bondietti et al., 1972).

In den eigenen Versuchen konnte Galacturonsäure nur in Spuren (kleiner 0,1 %) bei *C. coerulescens* nachgewiesen werden. Nach den Erkenntnissen von Gorin und Spencer (1968) kommen URONSÄUREN bei Pilz-Melaninen nur in einem sehr kleinen Prozentsatz vor. Wenn Uronsäuren detektiert werden, so kommt Galacturonsäure in einem etwas höheren Prozentsatz als Glucuronsäure vor (Linhares und Martin, 1979).

Auf der Basis von Abbaustudien schlug Nicolaus (1964, 1968) eine Einteilung der Melanine in Eu- und Allomelanine vor. Die Analyse der Spaltprodukte nach ALKALIFUSION brachte keinen eindeutigen Unterschied zwischen Eu- und Allomelaninen. Sowohl bei Tyrosin-, Dopa- und Catechol-Melanin als auch bei den Melaninen von *C. coerulescens* und *A. alternata* kann 3,4-Dihydroxybenzoesäure als Spaltprodukt identifiziert werden. Ebenfalls als Spaltprodukt nach Alkalifusion fanden Hackmann und Goldberg (1971) 3,4-Dihydroxybenzoesäure im Melanin von *Diptera* und *Coleoptera*. Die identifizierte Substanz scheint nicht spezifisch für eine Melaningruppe zu sein, da sie sowohl bei Eu- als auch bei Allomelaninen vorkommt. Eine Charakterisierung über den Nachweis von Indolen mit Hilfe von Ehrlich's Reagenz zeigt einen kleinen Unterschied auf. Die Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* als auch Tyrosin- und Dopa-Melanin werden mit Ehrlich's Reagenz zart gelb, während Catechol-Melanin eine orange-rote Farbe annimmt. Dieses Ergebnis zeigt eine gewisse Übereinstimmung der Melanine der untersuchten Bläuepilze mit den Eumelaninen. Mit der gleichen Methode fanden Ellis und Griffith (1974, 1975), daß aus Pilzen extrahierte Melanine Dopa- oder Indolderivate als Vorstufen haben. Demzufolge würden Pilz-Melanine eher den Eumelaninen zu zurechnen sein. Doch Jepson (1960) und Bell et al. (1976) zeigten, daß der Test mit Ehrlich's Reagenz nicht spezifisch für Indole ist. Ihre untersuchten Substanzen *m*-Dihydroxyphenol, sowie gewisse Hydroxyl-derivate des Naphthalins ergaben mit Ehrlich's Reagenz eine den Indolen ähnliche Farbreaktion. Gegen die Zuordnung der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* zu den Eumelaninen spricht der niedrige Stickstoffgehalt (2,45 bzw. 1,82 %), während die untersuchten Eumelanine (Dopa- und Tyrosin-Melanin) einen Stickstoffgehalt von ca. 6,9% hatten. Ebenfalls ist aus der Literatur (Kitamura und Kondo, 1958; Thomas, 1958) bekannt, daß der Stickstoffgehalt von Dopa-Melanin zwischen 8 und 11 % liegt.

Eine weitere Abbaustudie (PERMANGANATOXIDATION) brachte keine weiteren Hinweise hinsichtlich der Klassifizierung der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata*. Die HPLC-Trennungsdiagramme zeigen sowohl bei den Melaninen der Bläuepilze als auch der Vergleichssubstanzen einen ähnlichen Verlauf. Die von Hackmann und Goldberg (1971) beschriebenen Pyrrolcarbonsäuren konnten nicht identifiziert werden. Ein Farbnachweis auf Pyrrole blieb ergebnislos.

Eine direkte Zuordnung der Melanine der untersuchten Bläuepilze zu einer von Nicolaus (1964, 1968) willkürlich vorgenommenen Einteilung der Melanine ist schon auf Grund der Sonderstellung der Mycophyta (Pilze) sehr fragwürdig. Pilze werden traditionsgemäß den Pflanzen zugeordnet, besitzen aber im Gegensatz zu den Pflanzen nie Photosynthesepigmente sondern leben heterotroph; auch differieren viele ihrer Stoffwechselwege. Gleichfalls ist aus der Literatur (Swan, 1974) bekannt, daß natürliche Melanine, vor allem aus Pilzen extrahierte, nicht eindeutig klassifizierbar sind. Um eine Klassifizierung der Melanine der untersuchten Bläuepilze vornehmen zu können, müßten Biosynthese-Studien, wie sie von Bell und Wheeler (1986) beschrieben wurden, vorgenommen werden. Sie fanden bei Ascomyceten und Deuteromyceten unter anderem bei *A. alternata* mit Hilfe von Hemmstoff- und Enzyme-assay-Versuchen 1,8-Dihydroxynaphthalin (DHN) als Produkt der Melaninsynthese und nannten die so über den Pentaketid-Biosyntheseweg gebildeten Melanine DHN-Melanine. Dieselben Autoren fanden außerdem, daß bei *Agaricus bisporus* das zellwandgebundene Melanin offensichtlich aus γ -Glutaminyl-4-hydroxybenzol (GHB) synthetisiert wird. Shikimisäure ist eine Vorstufe von GHB. GHB soll dann zu γ -Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol (GDHB) oxidiert werden. Das so synthetisierte Melanin ist demzufolge ein GDHB-Melanin. Weitere Studien der vorher genannten Autoren bewiesen ein Catechol-Melanin in den Teliosporen von *Ustilage maydis*, sowie Dopa-Melanine bei anderen Pilzen. Durch diese Untersuchungen wird die Vielfältigkeit der Melanin-Synthesewege bei Pilzen deutlich.

Die Melanine der untersuchten Bläuepilze *C. coerulescens* und *A. alternata* sind sehr komplex. Ihre Grundstruktur besteht aus Aliphaten mit einem geringen Aromaten-Anteil sowie funktionellen Gruppen (Methoxyl-, Carboxyl-, Car-

bonyl- und Hydroxyl-Gruppen). Weitere mit dem Polymer assoziierte Stoffe sind "Proteine" und Kohlenhydrate. Zumindest ein Teil des "Proteins" sollte über Wasserstoffbrücken gebunden vorliegen, wie die Ergebnisse aus den Elektrophorese-Versuchen vermuten lassen. Ohne die Grundstruktur der Melanine zu beeinflussen können durch Hydrolyse sowohl "Proteine" als auch Kohlenhydrate abgetrennt werden. Denkbar wäre, daß "Protein" und Kohlenhydrat zum Teil über Aminozucker verbunden sind. Durch Alkalifusion bzw. Permanganatoxidation kann das Polymer in mehrere Komponenten zerlegt werden. Auf Grund dessen wird vermutet, daß das Polymer aus mehreren Struktureinheiten aufgebaut ist. Anschaulich können die gefundenen Fakten sowie vermuteten Zusammenhänge in folgendem, theoretischen Modell (Abb. 41) dargestellt werden. Für die mit den Melaninen strukturell als verwandt angesehenen Huminstoffe (Römpf, 1985) wurden ebenfalls Modelle (Haworth, 1971; Ziehm, 1980) vorgeschlagen.

Die im ACETONEXTRAKT gefundenen Phenole und Anthrachinone könnten an der Melaninsynthese beteiligt sein. Saiz-Jimenez und Shadizadeh (1985) vermuten, daß phenolische Polymere sowie Melanine in Pilzen über Oxidation von Phenolen und durch oxidative Kupplungsreaktionen von Phenolen mit Chinonen gebildet werden.

Die BLAUE FARBE des HOLZES kommt durch das Durchschimmern der durch Melanineinlagerungen dunkel gefärbten Hyphen der Bläuepilze zustande. Von dieser optischen Erscheinung der Blaufärbung berichteten schon 1878 Hartig und wenige Jahre später Münch (1907, 1908), ohne das für die Dunkelfärbung der Hyphen verantwortliche Pigment gekannt zu haben. Künstliche Imprägnierungsversuche mit den extrahierten Melaninen von *C. coerulescens* und *A. alternata* sowie Tyrosin-, Dopa- und Catechol-Melanin lieferten den Beweis, daß Melanine Holz dunkel färben. Die "blaue Farbe" ist abhängig von der Melanin-Konzentration. Überträgt man diese Erkenntnis auf die natürliche Bläue so bedeutet das: je mehr Hyphen im Holz sind, desto dunkler ist die Verfärbung.

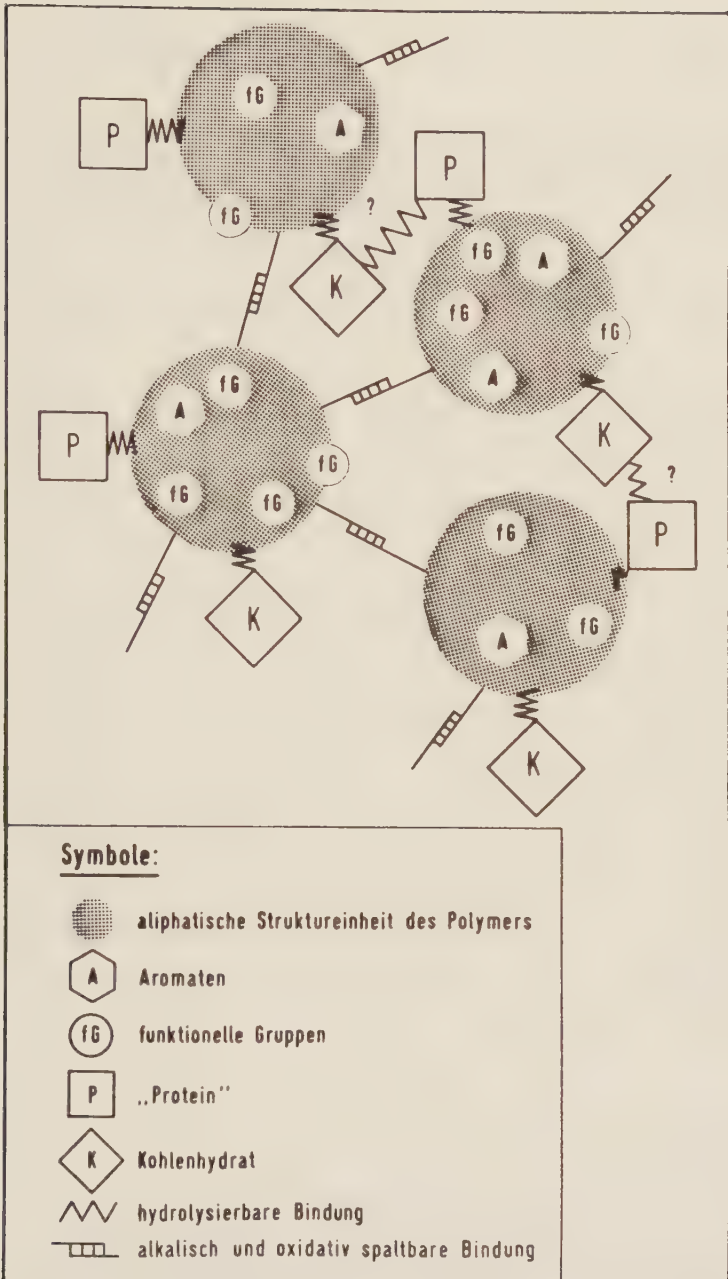


Abb. 41: Mögliches theoretisches Modell der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata*.

8. SCHLUßBETRACHTUNG

Die ersten exakten Untersuchungen über die "BLÄUE" sind von Hartig schon 1878 durchgeführt worden. Er bewies, daß die blaue Farbe des Holzes durch dunkelgefärbte Pilzhyphen hervorgerufen wird. An dieser Auffassung über die Natur der Verblauung hat sich bis heute nichts Wesentliches geändert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte als Pigment der Pilzhyphen zweier Bläuepilze *C. coerulescens* und *A. alternata* Melanin identifiziert und charakterisiert werden.

Da neben Nadelholz (Kiefer, Fichte, Tanne, Lärche und Douglasie), auch einheimisches Laubholz (Buche und Eiche) sowie Tropenholz z.B. Ramin bei entsprechender Feuchte und Temperatur zur Verblauung neigt, wäre es wichtig, nachdem nun das für die dunkle Farbe der Hyphen verantwortliche Pigment identifiziert ist, hier mit dem "Bläueschutz" anzufangen. Bislang wurde, um einen Bläuebefall und die damit verbundene Wertminderung zu vermeiden, häufig vor allem in den Exportländern unmittelbar nach dem Einschnitt eine vorbeugende chemische Schutzbehandlung (sogen. "gebadete Ware") vorgenommen (Willeitner et al., 1986). Jahrzehntelang wurden dazu Pentachlorphenol (PCP)-haltige wasserlösliche Präparate, Na-PCP, quecksilberhaltige Mittel, Bor- und Fluorsalze sowie Thioharnstoff eingesetzt. Mögliche gesundheitliche Risiken durch Holzschutzwirkstoffe, insbesondere von PCP beunruhigen Verbraucher und betroffene Branchen der Holzwirtschaft. Weiterhin ist bekannt, daß alle Bläueschutzmittel Haut- oder Magengifte sind. (Schultz, 1954). Bläubleichmittel, die kleine Bläuestellen in sonst gutem Holz beseitigen, sind für eine Anwendung im größerem Maßstab schon in Hinsicht auf den Preis nicht geeignet.

Ein neuer Schutz vor der "Bläue" könnte vielleicht darin gesehen werden, die Pigmentbildung zu unterdrücken oder zu verhindern. Wenn Melanine für die Pilze einen Schutz vor dem Austrocknen darstellen, würden Bläuepilze deren Melaninsynthese gehemmt ist, unweigerlich im Laufe des Austrocknens des Holzes absterben, ohne unerwünschte blaue Flecken und Streifen zu hinterlassen. Weitere Untersuchungen vor allem im Hinblick auf die Melaninbiosynthese in Bläuepilzen sind dazu notwendig.

9. ZUSAMMENFASSUNG

1. Am Beispiel von zwei Bläuepilzen wurde die Struktur und die Eigenschaften des Farbstoffes dieser Pilzgruppe erforscht. Als Untersuchungsmaterial wurde ein zu der Gruppe der Ascomyceten gehörender Pilz, *Ceratocystis coerulescens* (Münch) Bakshi, sowie ein zu den verblauenden Moderfäuleerregern gehörender Fungi imperfecti *Alternaria alternata* (Fries) Keissler gewählt.
2. Die für die Dunkelfärbung der Hyphen von *C. coerulescens* und *A. alternata* verantwortlichen Pigmente gehören in die weitgefaßte Gruppe der Melanine.
3. Die Pigmentbildung ist altersabhängig und geht einher mit der Endokonidien- bzw. Chlamydosporenbildung.
4. Die Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* sind zellwandgebunden.
Im Lichtmikroskop ist die Zellwand dunkelpigmentiert erkennbar.
Im Raster-Elektronenmikroskop stellt sich die Oberfläche von jungen Hyphen als glatte Fläche dar. Mit zunehmendem Alter kommt es zu warzigen Auswüchsen, die wahrscheinlich mit dem eingelagerten Melanin im Zusammenhang stehen.
Transmissions-elektronenmikroskopische Bilder zeigen, daß die im Laufe der Entwicklung immer stärker auftretenden granulären, hochkontrastierten Cytoplasma- und Zellwandstrukturen mit der makroskopisch sichtbaren Pigmentsynthese korreliert sind. Ob die Cytoplasma-granulae tatsächlich Melaninvorstufen darstellen, wurde nicht abgeklärt. Als gesichert kann gelten, daß die Melanine granulär in die Zellwand eingelagert sind.
5. Die Extinktionskurven im UV/VIS-Bereich zeigen die für Melanine typischen Spektren. Alle untersuchten Melanine haben einen ähnlichen Kurvenverlauf mit einem Maximum bei 216 nm und einer leichten Schulter im Bereich von 260-280 nm, deren Ursache aromatische oder chinoide Strukturelemente sein können. Weitere konstitutionelle Merkmale sind daraus nicht herleitbar.

6. Die von Jones (1970) als charakteristische IR-Banden für Melanine beschriebenen Absorptionen bei 3450, 1700, 1615, 1240 und 830 cm^{-1} sowie ein diffuser Absorptionsbereich zwischen 3300 und 2400 cm^{-1} können bei allen fünf untersuchten Melaninen nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der IR-Spektren vor Hydrolyse mit denen nach Hydrolyse verdeutlicht die Abspaltung von proteinartigem Material. Die Grundstruktur der Melanine wird durch Hydrolyse nicht beeinflusst.

Vergleichende FTIR-Spektren zeigen einen nahezu identischen, vorwiegend aus Aliphaten bestehenden, Aufbau der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata*.

Die Reduktion der Pigmente mit NaBH_4 führt bei allen fünf untersuchten Melaninen zu einer Entfärbung. Im IR-Spektrum kann eine deutlich intensivere Bande der C-CH_3 -Gruppe sowie eine abgeschwächte Bande der Carbonylgruppe festgestellt werden.

Die Acetylierung führt zu einer Abschwächung der Bande der Hydroxylgruppe sowie der C=O - der Carboxylgruppe. Intensiver wird die Bande der C-CH_3 -Gruppen gleichfalls spaltet sich der "finger-print"-Bereich detaillierter auf.

7. Kernresonanzspektren wurden zur Strukturaufklärung herangezogen. ^1H -NMR-Spektren zeigen, daß durch Hydrolyse "Proteine" und Kohlenhydrate abgespalten wurden. In Übereinstimmung mit der IR-Spektroskopie wurde deutlich, daß die Grundstruktur der Melanine durch Hydrolyse unbeeinflusst bleibt. Bestätigt wurde der vorwiegend aliphatische Aufbau der Polymere.

An Hand der ^{13}C -NMR-Spektren macht sich die Komplexität der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* in Form von Peaks, Schultern oder Plateaus in den Signalbereichen von aliphatischen -, proteinartigen-, polysaccharidischen-, aromatischen- und Carboxyl-Gruppen deutlich. Außerdem konnte festgestellt werden, daß auch nach Hydrolyse noch schwache "Proteinsignale" vorhanden waren. Demzufolge müßte ein nichthydrolysierbarer "Proteinteil" mit dem Pigment assoziiert sein.

8. Die Massenspektroskopie wurde als weiteres analytisches Verfahren benutzt. Pyrolyse-Massenspektren vor Hydrolyse der Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata*

zeigen vorwiegend Signale von ungeradzahligen Fragmenten. Neben Massen, die für proteinartiges Material sprechen, werden Signale von Zuckerkomponenten detektiert. Nach Hydrolyse verlieren die Massen der "Protein-" und Kohlenhydrat-Komponente an Intensität. Neben vorwiegend aliphatischen Verbindungen, wie Alkenen und Alkanen, können auch aromatische Spaltprodukte identifiziert werden, die in den NMR-Spektren nicht so deutlich zutage traten.

9. Die CHN-Analyse liefert für das Melanin von *C. coerulescens* nach Hydrolyse einen Wert für Kohlenstoff von 54,95%, Wasserstoff 7,06%, Stickstoff 2,45% und Sauerstoff 35,54%. Durch Hydrolyse kommt es zu einem Gewichtsverlust von 52,2% und einem Verlust an Stickstoff von 70,8%.
Bei *A. alternata* sind die Werte für Kohlenstoff 64,49%, Wasserstoff 9,3%, Stickstoff 1,82%, aus der Differenz wurde ein Sauerstoff-Wert von 24,39% berechnet. Neben einem, durch die Hydrolyse, bedingtem Gewichtsverlust von 50,5% kommt es zu einem Stickstoffverlust von 50,1%.
10. Aus den Werten der CHN-Analyse können weitere Aussagen abgeleitet werden. Das H/C-Verhältnis zeigt, daß die untersuchten Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* sehr komplexe Polymere mit überwiegend aliphatischer Struktur sind. Auf Grund des H/C-Verhältnisses kann davon ausgegangen werden, daß ca. 55 bis 75% der Kohlenstoff-Atome in aliphatischer Form vorliegen. Die O/C-Werte geben Auskunft über den Grad an Sauerstoffs substituenten.
11. Die E_4/E_6 -Werte der untersuchten Melanine von *C. coerulescens* und *A. alternata* lassen ebenfalls auf einen komplexen Aufbau beider Polymere schließen.
12. Von allen fünf untersuchten Melaninen wurden die funktionellen Gruppen bestimmt. Die Gesamtacidität liegt zwischen 2,72 und 4,04 meq/g. Für *C. coerulescens* wurde ein Wert von 3,57 meq/g für *A. alternata* von 2,8 meq/g ermittelt. Die Acidität beruht vorwiegend, mit Ausnahme von Catechol-Melanin, auf phenolischen OH-Gruppen. Den dominierenden Teil der Gesamt-OH-Gruppen stellen die aliphatischen OH-Gruppen mit 66-82% dar.

Carbonylwerte bewegen sich zwischen 6,5 und 9,6 meq/g, wobei bei *C. coerulescens* 47%, bei *A. alternata* 54%, beim Tyrosin-Melanin 30%, beim Dopa-Melanin 33% und beim Catechol-Melanin 38% der Carbonylgruppen in Form von Chinonen vorliegen.

13. In den fünf untersuchten Melaninen liegt der vorhandene Sauerstoff zwischen 78 bis 99% in Form der experimentell bestimmten funktionellen Gruppen gebunden vor. Im Melanin von *C. coerulescens* sind 90% des Sauerstoffes in Form dieser funktionellen Gruppen gebunden, bei *A. alternata* 99%. Demzufolge können in den Polymeren nur wenig Etherbrücken vorhanden sein.

14. Mit den Polymeren von *C. coerulescens* assoziiert ist eine proteinartige Komponente. Die Aminosäuren-Analyse ergab die für Proteine typischen Aminosäuren in fast identischer Quantität und Qualität. Rechnerisch ergab sich ein Molekulargewicht der proteinartigen Komponente von 13250 (*C. coerulescens*) und 14429 (*A. alternata*). An Hand des Aminosäuren-Gehaltes wurde ein Anteil von 12,3% bei *C. coerulescens* und 10,2% bei *A. alternata* an proteinartigem Material im Polymer berechnet. Mit Hilfe der Elektrophorese kann ein Teil des "Proteins" vom Polymer abgetrennt werden. Es wird angenommen, daß zumindest dieser Teil des "Proteins" über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Pigment verbunden ist. Zudem zeigen NMR- und MS-Untersuchungen, daß nicht-hydrolysierbares Protein zusätzlich mit dem Pigment gekoppelt sein muß.

15. Weitere mit dem Pigment assoziierte Komponenten sind Kohlenhydrate. Die Hexosen Mannose, Galactose und Glucose sowie die Pentose Xylose wurden im Hydrolysat der Pigmente von *C. coerulescens* und *A. alternata* gefunden. Qualitativ ist die Zuckerzusammensetzung bei beiden Melaninen gleich. Quantitativ ergeben sich Unterschiede bei den Zuckern Mannose und Galactose. Der ermittelte Kohlenhydratgehalt liegt bei 13,4 % (*C. coerulescens*) und 11,5% (*A. alternata*). Uronsäuren können nur bei *C. coerulescens* in einem verschwindend kleinem Prozentsatz (0,1%) nachgewiesen werden. Die mit Hilfe der Elektrophorese abgetrennte protein-

artige Komponente enthält sowohl bei *C. coerulescens* als auch bei *A. alternata* Spuren von Glucose und Mannose.

16. Abbaustudien (Alkalifusion und Permanganatoxidation) zeigen, daß eine Einteilung der Melanine nach Nicolaus (1964, 1968) bei den Melaninen der untersuchten Bläuepilze nicht möglich ist. Dies entspricht dem aus der Literatur (Swan, 1974) bekanntem Befund, daß natürliche Melanine, vor allem aus Pilzen extrahierte, nicht eindeutig klassifizierbar sind. Nach Alkalifusion konnte mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC 3,4-Dihydroxybenzoesäure bei allen fünf analysierten Melaninen identifiziert werden.
17. Für den Aufbau der Melanine der Bläuepilze *C. coerulescens* und *A. alternata* wurde ein theoretisches Modell entworfen. An die vorwiegend aus Aliphaten mit geringem Aromatenanteil aufgebaute Grundstruktur sind funktionelle Gruppen, "Proteine" und Kohlenhydrate assoziiert.
18. Neben dem eigentlichen Pigment (Melanin) konnte aus dem Myzel von *C. coerulescens* und *A. alternata* mit Aceton eine weitere Komponente isoliert werden. Eine genaue Identifizierung wurde nicht vorgenommen. Die vorliegenden Befunde deuten darauf hin, daß es sich bei den isolierten Substanzen um Phenole und Anthrachinone handelt, die möglicherweise an der Pigmentbildung beteiligt sind.
19. Kiefernspiltholzklötzchen wurden künstlich mit Rein- kulturen von *C. coerulescens* bzw. *A. alternata* infiziert. Es kam dadurch zu einer Dunkelfärbung des Holzes. Die für Bläuepilze charakteristische "blaue Farbe" des Holzes ist ein Phänomen des Durchschimmerns der dunkel gefärbten Hyphen durch das Holz und kommt vermutlich durch das Zusammenspiel von Pilzhyphe und Holzzellen zustande.
20. Ob die extrahierten Melanine aus *C. coerulescens* und *A. alternata* zu einer Verfärbung des Holzes führen, wurde mittels Imprägnierungsversuchen untersucht. Sowohl die Melanine der untersuchten Pilze als auch Tyrosin-, Dopa- und Catechol-Melanin führten zu einer dunklen Färbung des verwendeten Kiefernspiltholzes.

10. LITERATUR

Adams, G.A., 1965: Methods in Carbohydrat Chemistry. Hrsg. Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Vol. V., S. 269-276, Academic Press, New York.

Ammer, U., 1963: Untersuchungen über den Schutz von Kiefernholz gegen Bläue. Forstwiss. Centralbl. 85, 165-178.

Anonymus, 1978: Die Holzwirtschaft lebt von Hoffnungen. Der Holzmarkt im Dezember - Rückläufige Schnittholzpreise - steigende Stammholzpreise. Holz-Zentralbl. 104, H. 8, S. 123 und Schnittholzabsatz unterschiedlich, H. 2/3, S. 22.

Arx, J.A. von, 1967: Pilzkunde. S. 356, J. Cramer, Lehre.

Aufsess, H., v., 1980: Untersuchungen über das Auftreten der "Innenbläue" in Kiefern Schnittholz. Forstwiss. Centralbl. 90, 233-242.

Ayer, W.A., L.M. Brownw, M.Feng, H. Orszanska, H. Saeedi-Ghomi, 1985 a: The chemistry of the blue stain fungi. Part 1. Some metabolites of *Ceratocystis* species associated with mountain pine beetle infected lodgepole pine. Can. J. Chem. 64, 904-909.

Ayer, W.A., B. Kratochvil, E. Allen, L.M. Browne, C. Durfresne, D. Figueroa, A. Szenthe, 1985 b: The chemistry of the blue stain fungi. Part 2. Some essential metal levels of diseased and healthy lodgepole pine. Can. J. Chem. 64, 910-913.

Ayer, W.A., S.K. Attah-Poku, L.M. Browne, H. Orszanska, 1986: The chemistry of the blue stain fungi. Part 3. Some metabolites of *Ceratocystis* minor (Hedgcock) Hunt. Can. J. Chem. 65, 765-769.

Badun, S., 1960: Einfluß der Bläue auf die technischen Eigenschaften des Holzes. Summarsky List 84, H.11/12, 357-367.

Bakshi, B.K., 1950: Fungi associated with ambrosia beetles in Great Britain. Brit. Mycol. Soc. Trans. 33, 111-120.

Bakshi, B.K., 1951: Studies on four species of *Ceratocystis* with a discussion of fungi causing sap-stain in Britain. *Commonw. Myc. Inst. Myc. Pap. No. 35*, 16.

Barker, S.A., M.H.B. Hayes, R.G. Simmonds, M. Stacey, 1967: Studies on soil polysaccharides I. *Carbohydr. Res.* 5, 13-24.

Bavendamm W., 1939: Erkennen, Nachweis und Kultur der Holzverfärbenden und Holzzeretzenden Pilze. In: Abderhalden, E. (Hrsg): *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden* Abt. XII, Teil 2/III, S. 929-1120, Urban und Schwarzenberg, Berlin, Wien.

Bavendamm, W., 1969: Der Hausschwamm und andere Bauholzpilze. S. 49-53, Gustav Fischer, Stuttgart.

Bell, A.A., J.E. Puhalla, W.J. Tolmsoff, R.D. Stipanovic, 1976: Use of mutants to establish (+) scytalone as an intermediate in melanin biosynthesis by *Verticillium dahliae*. *Can. J. Microbiol.* 22, 789-799.

Bell, A.A., M.H. Wheeler, 1986: Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24, 411-451.

Bender H., J. Lehmann, 1959: Pullulan, ein extracelluläres Glucan von *Pullularia pullulans*. *Biochem. Biophys. Acta* 36, 309-316.

Björkman, W.E., 1963: Chemical combating of blue stain and storage decay in pine (*Pinus silvestris* L.) and spruce (*Picea abies* Karst.) saw timber. *Sven. Skogsvardsfoeren. Tidskr.* 2.

Berndt, H., 1967: Enzymatische Untersuchungen an Bläuepilzen. Diplom-Arbeit Universität Hamburg.

Berndt, H., W. Liese, 1971: Untersuchungen über die Enzyme von Bläuepilzen. *Arch. Mikrobiol.* 70, 140-146.

Bloomfield, B.J., M. Alexander, 1967: Melanin and resistance of fungi to lysis. *J. Bacteriol.* 93, 1276-1280.

Bondietti, E., J.P. Martin, K. Haider, 1972: Stabilization of amino sugar units in humic-type polymers. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 36, 597-602.

Breitmaier, E., W. Voelter, 1974: ^{13}C -NMR spectroscopy. S. 515, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Browning, B.L., 1967: Methods of wood chemistry. Vol. II, S. 757-758. Interscience publishers. A division of John & Sons, New York, London, Sydney.

Bull, A.T., 1970: Inhibition of polysaccharoses by melanin: enzyme inhibition in relation to mycolysis. Arch. Biochem. Biophys. 137. 345-356.

Bunning S., D.A. Griffiths, 1984: Spore development in species of *Periconia* II, *P. byssoides* and *P. igniaria*. Trans. Br. Mycol. Soc. 82, 397-404

Butovitsch, V., H. Eidmann, 1962: Die Behandlung von berindetem Nutzholz mit Insektiziden. Forstwiss. Centralbl. 81, 212-222.

Butin, H., 1965: Bläue an lackiertem Nadelholz. Holz-Zentralbl. Nr. 4, 37-39.

Cartwright, K.St. G., W.P.K. Findlay, 1958: Decay of timber and its prevention. S. 332, Her. Majesty's stationery office, London.

Chapman, A.D., T.C. Scheffer, 1940: Effect of blue stain on specific gravity and strength of southern pine. J. Agric. Res. 61, 2.

Clark F.E., K.H. Tan, 1969: Identifikation of a polysaccharide ester linkage in humic acid. Soil Biol. Biochem. 1, 75-81.

Colthup, N.b., L.H. Daly, S.E. Wiberley, 1964: Introductions to infrared and raman spectroscopy. S. 511, Academic press, New York.

Commoner, B., J. Townsend, G.E. Pake, 1954: Free radicals in biological materials. Nature 174, 689-691.

Courtois, H., 1963: Beitrag zur Frage holzabbauender Ascomyceten und Fungi imperfecti. Holzforschung 17, Nr. 6, 176-183.

Davidson, R.W., 1935: Fungi causing stain in logs and lumber in the Southern States, including five new species. J. Agrc. Res. 50, 789-807.

Davidson, R.W., 1942: Some additional species of Ceratostomella in the United States. Mycologia 34, 650-662.

Davidson, R.W., 1953: Two common lumber-staining fungi in the Western United States. Mycologia 45, 579-586.

Durrell, L.W., 1964: The composition and structure of walls of dark fungus spores. Mycopathol. Mycol. Appl. 23, 339-345.

Elliot J.A., 1923: The ascigerous stage of the sweet potato black-rot fungus. Phytopath. 13, 56.

Ellis, D.H., D.A. Griffiths, 1974: The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi. Can. J. Microbiol. 20, 1379-1386.

Ellis, D.H., D.A. Griffiths, 1975: Melanin deposition in the hyphae of a species of Phomopsis. Can. J. Microbiol. 21, 442-452.

Fengel, D., M. Pryzklenk, G. Wegener, 1976: Hydrolyse von Polysacchariden mit Trifluoressigsäure. Papier Darmstadt 30, 240-243.

Fengel D., G. Wegener, 1979: Hydrolysis of polysaccharides with trifluoroacetic acid and its application to rapid wood and pulp analysis. Wood and pulp analysis, 145-158.

Filip, Z., K. Haider, H. Beutelspacher, J.P., Martin, 1974: Comparison of IR-spectra from melanin of microscopic soil fungi, humic acids and model phenol polymers. Geoderma 11, 37-52.

Filip, Z., J. Semotan, M. Kutilek, 1976: Thermal and spectrophotometric analysis of some fungal melanins and soil humic compounds. Geoderma 15, 131-142.

Findlay, W.P.K., 1939: Effects of sap stain on the decay-resistance of pine sapwood. *Forestry* 13, 59-67.

Fitzpatrick, T.B., A. Kukita, F. Morikawa, M. Seiji, A.J. Sober, K. Toda, 1981: Biology and diseases of dermal pigmentation. S. 111, Univ. Tokyo press, Tokyo.

Flaig, W., J.Ch. Salfeld, 1958: UV-Spektren und Konstitution von p-Benzo-Chinonen. *Liebigs Ann. Chem.* 618, 117-139.

Flaig, W., H. Beutelspacher, E. Reitz, 1975: Chemical composition and physical properties of humic substances. S. 1-211. In: J.E. Gieseking (Hrsg.), *Soil components*. Vol. 1, Organic components. Springer, New York, Heidelberg, Berlin.

Fries, E., 1832: *Systema mycologicum* IV, S. 373.

Fritz, J.S., S.S. Yamamura, E.C. Bradford, 1959: Determination of carbonyl compounds. *Anal. Chem.* 31, 260-263.

Geis P.A., M.H. Wheeler, P.J. Szaniszlo 1984: Pentaketide metabolites of melanin synthesis in the dematiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*. *Arch. Microbiol.* 137, 324-328.

Goidanich, G., 1953: Le alterazioni cromatiche parasitarie del legname in italia. *R. Staz. Veg. Boll.* 16, 225-273.

Gonzalez-Vila, F.J., H. Leutz, H.D. Lüdemann, 1976: FT ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 72, 1063-1070.

Gonzalez-Vila, F.J., C. Saiz-Jimenez, H. Lentz, H. Lüdemann, 1978: ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of fungal melanins. *Z. Naturforschung* 33c, 291-293.

Gorin, P.A.J., J.F.T. Spencer, 1968: Structural chemistry of fungal polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem.* 23, 367-417.

Griffiths D.A., 1982: Structure of *Verticillium nigrescens* and *V. nubilum* chlamydospores. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 78, 141-145.

Grosmann, H., 1931: Beiträge zur Kenntnis der Lebensgemeinschaft zwischen Borkenkäfern und Pilzen. Z. Parasitenk. 3, 56-102.

Grosmann, H., 1932: Über die systematische Beziehungen der Gattung *Leptographium* Lagerberg et Melin, Zur Gattung *Ceratostomella* Sacc. Hedwigian 72, 183-194.

Grosser, D., 1985 : Pflanzliche und tierische Bau- und Werkstoffschädlinge. S. 159, DRW, Stuttgart.

Hackmann, R.H., M. Goldberg, 1971: Microchemical detection of melanins. Anal. Biochem. 41 (1), 279-285.

Haider, K., L.R. Frederick, W. Flaig, 1965: Reactions between aminoacid compounds and phenols during oxidation. Plant Soil 22, 49-64.

Haider, K., J.P. Martin, Z. Filip, 1975: Humus biochemistry. S. 195-244. In: E.A. Paul and A.D. Mc Laren (Hrsg.). Soil biochemistry. Vol. 4. Marcel Dekker, New York.

Haider, K., B.R. Nagar, C. Saiz-Jimenez, H.L.C. Meuzelaar, J.P. Martin, 1977: Studies on soil humic compounds, fungal melanins and model polymers by pyrolysis-mass spectrometry. In Soil organic matter studies, Vol. 2. S. 213-220, IAEA, Vienna.

Halsted B.D., 1890: Some fungous diseases of the sweet potato. The black rot. N. J. agr. Expt. Sta. Bul. 76, 7-14.

Hatcher, P.G., R. Rowan, M.A. Mattingly, 1980a: ^1H - and ^{13}C -NMR of marine humic acids. Organ. Geochem. 2, 77-85.

Hatcher, R.G., D.L. Vander Hart, W.L. Earl, 1980b: Use of solid state ^{13}C -NMR in structural studies of humic acids from Holocene sediments. Organ. Geochem. 2, 87-92.

Hatcher, P.G., M. Schnitzer, L.W. Dennis, G.E. Maciel, 1981: Aromaticity of humic substances in soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 1089-1094.

Hartig, R., 1878: Die Zerstörungerscheinung des Holzes. S. 66, Springer, Berlin.

Hartig, R., 1900: Lehrbuch der Pflanzenkrankheiten, 3. Auflage, S. 108, Springer, Berlin.

Haworth, R.D., 1971: The chemical nature of humic acid. Soil. Sci. 111, 71-79.

Hegnauer, H., L.E. Nyhlen, D.M. Rast, 1985: Ultrastructure of native and synthetic *Agaricus bisporus* melanins - Implication as to the compartmentation of melanogenesis in fungi. Exp. Mycol. 9, 221-229.

Hirsch, K.A., 1978: War die Innenbläue doch Schuld? Holz-Zentralbl. 104, H. 47, S. 715.

Holzschädlingstafel, 1954: Bläuepilze. Holz Roh- Werkst. 12, 205-208.

Hunt, J., 1956: Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. Lloydia 19, 1-23.

Hyde, H.A., D.A. Williams, 1953: The incidence of *Cladoporium herbarum* in the outdoor air at Cardiff. 1949-1950. Trans. Brit. Soc., 36, 260-266.

Jepson, I.E., 1960: Indoles and related Ehrlichs reactors. In: Chromatographic and electrophoretic techniques. J. Smith (Hsrg.), S. 193-211, Interscience Publishers, Inc. New York.

Jones, D., 1970: Ultrastructure and composition of the cell-walls of *Sclerotinia sclerotiorum*. Trans. Br. Mycol. Soc., 54, 351-360.

Kasatochkin, V.I., M.M. Kononova, N.K. Larina, O.I. Egorova, 1964: Theses on spectral and x-ray investigations of chemical structure of humic substances in soil. 8th Intern. Congr. Soil Sci., Bucharest, 81-86.

Kitamura, Y., T. Kondo, 1958: Chemical study on blue stained pine wood. On the pigment obtained from mycelia of blue stain fungi. Mokuzai Gakkaishi 4, 51-55.

Kirk, T.K., L.F. Lorenz, M.J. Larsen, 1975: Partial characterization of a phenolic pigment from sporocarps of *Phellinus igniarius*. Phytochem. 14, 281-284.

Kleist, H., D. Mücke, 1966: Optische Untersuchungen an Huminsäuren. Albrecht-Thaer-Archiv, 10, 471-484.

Knigge, W., H. Schulz, 1966: Grundriss der Forstbenutzung. S. 199, Parey, Hamburg, Berlin.

Koljo, B., 1957: Untersuchungen über die Holzverfärbung durch Eisen. Holz Roh- Werkst. 15, 496-499.

Kollmann, F., Keylwirth, R., Kübler, H., 1951: Verfärbungen des Vollholzes und der Furniere bei der künstlichen Holz Trocknung. Holz Roh- Werkst. 9, 382-391.

Kozlova, T.M., S.P. Lyakh, 1981: Morphological and ultrastructural features of black yeast *Nadsoniella nigrar* var *psychrophilica*. Microbiology USSR, 50, 198-202.

Krevelen, D.W. van, 1950: Graphical statistical method for the study of structure and reaction processes in coal. Fuel 29, 269-284.

Kukhareenko, T.A., L.N. Yekaterininia, 1967: Method of determining quinoid groups in humic acids. Soviet. Soil Sci. (English translation) 7, 933-939.

Lagerberg, T., G. Lundberg, E. Melin, 1927: Biological and practical researches into blueing in pine and spruce. Sven. skogsvardsfören. Tidskr. 25, 196-267.

Laštůvka, Z., L. Scháněl, 1957: Die Pigmentation des Pilzes *Cerastomella pilifera* Fries und ihre Abhängigkeit von der Stickstoffernährung. Publ. Fac. Sci. Univ. Masaryk, Brno, No. 338, 431-450.

Leistner, E., 1971: A second pathway leading to anthraquinones in higher plants. Phytochem. 10, 3015-3020.

Lentz, H., H.D. Lüdemann, W. Ziechmann, 1977: Protonen resonance spectra of humic acids from the solum of a podzol. Geoderma 18, 325-328.

Levy, G.C., G.L. Nehon, 1972: Carbon-13-nuclear magnetic resonance of organic chemist. S. 222, Wiley-Interscience, New York.

Liese W., R. Schmid, 1961: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Wachstum von Bläuepilzen in Kiefern- und Fichtenholz. Holz Roh- Werkst. 19, 329-337.

Liese W., R. Schmid, 1964: Über das Wachstum von Bläuepilzen durch verholzte Zellwände. Phytopath. Zeitsch. 51, H. 4, 385-393.

Linderman, R.G., T.A. Toussoun, 1966: Behavior of albino chlamydospores of *Thielaviopsis basicola*. Phytopath. 56, 887.

Linhares, L.F., J.P. Martin, 1979: Carbohydrate content of fungal humic-acid-type polymers (melanins) Soil. Sci. Soc. Am. J. 43, 313-318.

Lockwood, J.L., 1960: Lysis of mycelium of plant pathogenic fungi by natural soil. Phytopath. 50, 787-789.

Lüdemann, H.D., H. Nimz, 1974: ¹³C-Kernresonanzspektren von Ligninen 1. Makromol. Chem. 175, 2393-2407.

Lüdemann, H.D., H. Leutz, J.P. Martin, 1982: Carbon-13-nuclear magnetic resonance spectra of some fungal melanins and humic acids. Soil Sci. Soc. Am. J. 46, 957-962.

Luthard, W., H. Lyr, 1965: Über die Bildung von Tyrosinase bei holzerstörenden Pilzen. Arch. Mikrobiol. 51, 103-117.

Lyr H., 1964: Alterung und Enzymbildung bei höheren Pilzen. Z. allg. Mikrobiol. 4, 249.

Mathiesen, A., 1951: Einige neue Ophiostoma-Arten in Schweden. Sven. Bot. Tidskr., 45, 203.

Mathiesen-Käärik, A., 1955: Einige Untersuchungen über den Sporengehalt der Luft in einigen Bretterhöfen und in Stockholm. Sven. Bot. Tidskr., 49, 437-459.

Melin, E., J.A. Nannfeldt, 1934: Researches into the blueing of ground wood pulp. Sven. Skogvardsfören. Tidskr. 32, 397-616.

Meuzelaar, H.L.C., M.A. Posthumus, P.G. Kistemaker, J. Kistemaker, 1973: Curie point pyrolysis in direct combination with low voltage electron impact ionization mass spectrometry. Anal. Chem. 45, 1546-1549.

Meuzelaar, H.L.C., P.G. Kistemaker, M.A. Posthumus, 1974: Recent advances in pyrolysis mass spectrometry of complex biological materials. Biomedical. Mass Spectrom. 1, 312-319.

Meuzelaar, H.L.C., K. Haider, B.R. Nagar, J.P. Martin, 1977: Comparative studies of pyrolysis mass spectra of melanins, model phenolic polymers, and humic acids. Geoderma 17, 239-252.

Mörck, R., K.P. Kringstad, 1985: ^{13}C -NMR spectra of kraft lignins.II. Kraft lignin acetates. Holzforschung, 39, 109-119.

Mörck, R., H. Yoshida, K.P. Kringstad, 1986: Fractionation of kraft lignin by successive extraktion with organic solvents. I.Functional groups, ^{13}C -NMR-spectra and molekular weight distribution. Holzforschung, 40, 51-60.

Mombächer, R., 1988: Holz-Lexikon. Nachschlagewerk für die Holz- und Forstwirtschaft. S. 139, DRW, Stuttgart.

Münch, E., 1907, 1908: Die Blaufäule des Nadelholzes. Z. Forst- Landwirtsch. 5, 531-573; 6, 32-43, 217-323.

Neegard, P., 1945: Danish species of Alternaria and Stemphylium, taxonomy, parasitism, economical significance. Munksgaard, Copenhagen. Oxford Univ. Press, London.

Nees, von Esenbeck, C.G., 1817: System der Pilze und Schwämme, S. 72.

Neyroud, J.A., M. Schnitzer, 1974: The chemistry of high molecular weight fulvic acid fractions. Can. J. Chem. 52, 4123-4132.

Nicolaus, R.A., M. Piatelli, E. Fattorusso, 1964: The structure of melanins and melanogenesis IV. On some natural melanins. Tetrahedron 20, 1163-1172.

Nicolaus, R.A., 1968: Melanins, S. 130-142, 147-153, Hermann, Paris.

Nimz, H., H.D. Lüdemann, 1976: Kohlenstoff-13-NMR-Spektren von Ligninen, Lignin- und DHP-Acetate. *Holzforschung* 30, 33-40.

Parameswaran, N., M. Ruetze, 1984: Effect of methyl bromid fumigation on the ultrastructure of *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt. *Material und Organismus* 19, 133-140.

Pawelek, J.M., A.M. Korner, 1982: The biosynthesis of mammalian melanin. *Am. Sci.* 70, 136-145.

Pechak, D.G., R.E. Crang, 1979: Observations on melanin synthesis in the black yeast *Aureobasidium pullulans*. *Micron* 10, 207-208.

Pechmann, H., v., O. Schaile, 1950: Über die Änderung der dynamischen Festigkeit und der chemischen Zusammensetzung des Holzes durch den Angriff holzzerstörender Pilze. *Forstwiss. Centralbl.* 69, H. 8, 441-466.

Pechmann, H., v., A. Wutz, 1963: Untersuchungen über Bläuebefall und Möglichkeiten der Bläueverhütung an lagerndem Kiefernstammholz. *Forstwiss. Centralbl.* 82, 126-138.

Pechmann, H., v., E. Graessle, A. Wutz, 1964: Untersuchungen über Bläuepilze an Kiefernholz. *Forstwiss. Centralbl.* 83, 290-314.

Pechmann, H., v., H. v. Aufseß, W. Liese, U. Ammer, 1967: Untersuchungen über die Rotstreifigkeit des Fichtenholzes. *Forstwissenschaftl. Forschung, Beih. Forstwiss. Centralbl.* H. 27.

Philipp, B., G. Reinisch, 1976: Grundlagen der makromolekularen Chemie. S. 359, Akademie, Berlin.

Piatelli, M., E. Fattorusso, S. Magno, R.A. Nicolaus, 1962: The structure of melanins and melanogenesis II. Sepio-melanin and synthetic pigments. *Tetrahedron* 18, 941-949.

Piatelli, M., E. Fattorusso, R.A. Nicolaus, S. Magno, 1965: The structure of melanins and melanogenesis V. Ustilago-melanin. Tetrahydron 21, 3229-3236.

Pobiner, H., 1983: Improved inflection points in the non-aqueous potentiometric titration of acid functionalities in lignin chemicals by using internal standardization and ion exchange. Anal. Chem. Acta. 155, 57-65.

Potgieter, H.J., M. Alexander, 1966: Susceptibility and resistance of several fungi to microbial lysis. J. Bacteriol. 91, 1526-1532.

Posthumus, M.A., N.N.M. Nibbering, A.J.H. Boerboom, H.R. Schulten, 1974: Pyrolysis mass spectrometric studies on nucleic acids. Biomedical Mass Spectrom 1, 352-357.

Riederer von Paar, F., 1984: Gedanken über Auswirkung des Waldsterbens auf private Forstbetriebe. Forstwiss. Centralbl. 103, 171-176.

Robak, H., 1932: Investigations regarding fungi on norwegian ground wood pulp and fungal infection at Wood Pulp Mills. Nyt. Mag. Naturvid.71, 185-330.

Römpf's Chemielexikon, 1985: Hrsg. Dr. Otto-Albrecht Neumüller, 8.Auflage, Band 4: S.2528-2529. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart.

Rösch, R., W. Liese, H. Berndt, 1969: Untersuchungen über die Enzyme von Bläuepilzen. Arch. Mikrobiol. 67, 28-50.

Rösch, R., W. Liese, 1971: Untersuchungen über die Enzyme von Bläuepilzen. Arch. Mikrobiol. 76, 212-218.

Rumbold, C.T., 1931: Two blue stain fungi associated with barkbeetles infestations of pine. J. Agric. Res. 43, 847.

Russell, J.D., D. Jones, D. Vaughan, A.R. Fraser, 1980: A preliminary study of fungal melanin by infrared spectroscopy. Geoderma 24, 207-213.

Rypáček, V., 1966: Biologie holzzerstörender Pilze. S. 211, Fischer, Jena.

Saiz-Jimenez, C., F. Martin, 1975: Pyrolysis-gaschromatography of the pigment of *Eurotium echinulatum*. Humus et plants VI, Prag 18-22. Aug. 1975, S. 11-16.

Saiz-Jimenez, C., K. Haider, J.P. Martin, 1975: Anthraquinones and phenols as intermediates in the formation of dark-colored, humic acid-like pigments by *Eurotium echinulatum*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 39, 649-653.

Saiz-Jimenez, C., 1983: The chemical nature of the melanins from *Coprinus* spp. Soil Sci. 136, 65-74.

Saiz-Jimenez, C., F. Shafizadeh, 1985: Electron resonance spectrometry of fungal melanins. Soil. Sci. 139, 319-325.

Sandermann, W., Lüthgens, M., 1953: Untersuchungen über Verfärbungen von Hölzern. Holz Roh- Werkst. 11, 435-440.

Saur, I., G. Seehann, W. Liese, 1986: Zur Verblauung von Fichtenholz aus Waldschadensgebieten. Holz Roh- Werkst. 44, 329-332.

Savory, J.G., R.G. Pawsey, J.S. Lawrence, 1965: Prevention of Blue-stain in unpeeled scots pine logs. Forestry, 38, 59-81.

Schanel, L., 1962: Laccase-Aktivität und Lignin-Abbau durch holzerstörende Pilze (Tschechisch). Dissertation, Univ. Brno.

Scheffer, T.C., Lindgren, R.M., 1940: Stains of sapwood and sapwood products and their control. Techn. Bull. U.S. Dep. Agric. 714, 123.

Schmid R., W. Liese, 1965: Zur Außenstruktur der HYPEN von Bläuepilzen. Phytopath. Zeitsch. 54, (3), 275-284.

Schmid R., E. Baldermann, 1967: Elektronenoptischer Nachweis von sauren Mucopolysacchariden bei Pilzhyphen. Die Naturwissenschaften 19, 521-522.

Schmidt, O., 1985: Occurrence of microorganismen in the wood of Norway spruce trees from polluted sites. Europ. J. For. Pathol. 15, 2-10.

Schnitzer, M., 1971: Characterization of humic constituent by spectroscopy. In: A.D. Mc Laren and J. Skujins (Hrsg.) Soil Biochemistry, Vol. 2. S. 60-95, Marcel Dekker, New York.

Schnitzer, M., S.U. Khan, 1972: Humic substances in the enviroment. S. 327, Marcel Dekker, New York.

Schnitzer, M., M.J. Ortiz de Serra, K. Jvarson, 1973: The chemistry of fungal humic acid-like polymers and of soil humic acids. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 37, 229-236.

Schulten, H.R., H.D. Beckey, A.J.H. Boerboom, H.L.C. Meuzelaar, 1973: Pyrolysis field adsorption mass spectrometry of desoxyribonucleic acid. Anal. Chem. 45, 2358-2362.

Schulz, G., 1954: Schutz des Kiefernholzes vor Verblauung. Holzwirtschaftl. Jahrbuch (3), S. 79-86, Holzzentralblatt Verlags-GmbH.

Sciacovelli, O., N. Senesi, V. Solinas, C. Testini, 1977: Spectroscopic studies on soil organic fraction I. Soil Biol. Biochem. 9, 287-293.

Sealy, J., 1980: Free radicals. Biol. 4, 209-260.

Seifert, K., 1964: Die Veränderung der chemischen Holzzusammensetzung durch den Bläuepilz *Pullularia pullulans* (de Bary) Berkhout. Holz Roh- Werkst. 22, 405-409.

Siehr, D.J., 1981: Melanin biosynthesis in *Aureobasidium pullulans*. J. Coatings Tech. 53. 23-25.

Simon, L.T., D.S., Bishop, G.R., Hooper, 1979: Ultrastructure and cytochemical localization of laccase in two strains of *Leptosphaerulina briosiana* (Pollaci) Graham and Luttrell. J. Bacteriol. 137, 537-544.

Stothers, J.B., 1972: Carbon-13- NMR spectroscopy. Org. Chem. Ser. Monogr. 24, 1-547.

Swan, G.A., 1974: Structure, chemistry and biosynthesis of the melanins. Fortschritte der chem. org. Naturstoffe. Progress in the chemistry of org. natural products. 31. S. 522-582, Hrsg. L. Zechmeister, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Thomas, M., 1958: Melanin. Handb. Pflanzenphysiol. 8, 1076-1082.

Thunell, B., 1952: Einwirkung der Bläue auf die Festigkeitseigenschaften der Kiefer. Holz Roh-Werkst. 9, 362-365.

Verall, A.F., G.A. de Vries, 1941: Dissemination of fungi that stain logs and lumber. J. Agric. Res. 63, 549-558.

Vieböck, F., A. Schwappach, 1930: Eine Methode zur maßanalytischen Bestimmung der Methoxyl- und Ethoxylgruppen. Ber. 63, 2818-2823.

Vries, G.A. de, 1952: Contribution to the knowledge of the genus Cladosporium Link ex Fries. Dissertation, Baarn (Nederland).

Wegener, G., D. Fengel, 1988: Zum Stand der chemischen und mikroskopischen Untersuchungen an trocknungsverfärbtem Eichenschnittholz. Holz-Zentralbl. 114, 2238-2241.

Wheeler, M.H., W.J. Tolmsoff, S. Meola, 1976: Ultrastructure of melanin formation in Verticillium dahliae with (+)-scytalone as a biosynthesis intermediate. Can. J. Microbiol. 22, 702-711.

Wheeler, M.H., W.J. Tolmsoff, A.A. Bell, 1978: Ultrastructural and chemical distinction of melanins formed by Verticillium dahliae from (+) scytalone, 1,8-dihydroxynaphthalene, catechol and L-3,4,-dihydroxyphenylalanine. Can. J. Microbiol. 24, 289-297.

Wheeler, M.H., R.D. Stipanovic, 1979: Melanin biosynthesis in Thielaviopsis basicola. Exp. Mycol. 3, 340-350.

Willeitner, H., H.M. Illner, W. Liese, 1986: Vorkommen von Bläueschutzwirkstoffen in importierten Schnitthölzern unter besonderer Berücksichtigung von PCP. Holz als Roh- Werkst. 44, 1-5.

Williams, D.H., I. Fleming, 1973: Spectroscopic methods in organic chemistry. S. 346, Mc Graw-Hill, New York.

Wiltshire, S.P., 1933: The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. Trans. Brit. Myc. Soc. XVIII. 135-159.

Wolman, M., 1969: Pigments in pathology. Academic Press, New York.

Woloshuk, C.P., H.D. Sisler, E.L. Vigil, 1983: Action of the antipenetrant tricyclazole on appressoria of *Pyricularia oryzae*. Physiol. Plant Pathol. 22, 245-259.

Zhdanova, N.N., V.D. Pokhodenko, 1973: Possible participation of melanin pigment in protection of fungal cell from dehydration. Mikrobiologiya 43, 848-853.

Ziechmann, W., 1980: Huminstoffe. Probleme, Methoden, Ergebnisse. S. 408, Chemie, Weinheim, Deerffield-Beach, Florida, Basel.

Zimmermann, G., 1974: Untersuchungen über die Art und Ursachen von Verfärbungen an Bergahorn-Stammholz (*Acer pseudoplatanus* L.). Forstwiss. Centralbl. 93, 247-261.

Zycha, H., 1964: Einwirkung einiger Moderfäulepilze auf Buchenholz. Holz Roh-Werkst. 22, 37-42.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CaCl_2	= Calciumchlorid
FeCl_3	= Eisen(III)-chlorid
HCl	= Salzsäure
KBr	= Kaliumbromid
KCl	= Kaliumchlorid
K_2CO_3	= Kaliumcarbonat
KH_2PO_4	= Kaliumdihydrogenphosphat
KMnO_4	= Kaliumpermanganat
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	= Magnesiumsulfat
NaBH_4	= Natriumborhydrid
NaHCO_3	= Natriumhydrogencarbonat
NaOH	= Natronlauge
NH_4NO_3	= Ammoniumnitrat
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	= Natriumdithionit
P_2O_5	= Phosphorpentoxid
SnCl_2	= Zinn(II)-chlorid

LEBENS LAUF

Name		<u>Patrizia</u> , Kornelia Zink, geb. Eckle
geboren	am 12.03.1959	in Weingarten
Schul Ausbildung	1965-1968	kath. Volksschule Wein- garten
	1968-1974	Realschule Weingarten
	1974-1978	Wirtschaftsgymnasium Ravensburg, Abschluß: Abitur
Studium	1978-1979	Pädagogische Hochschule Weingarten
	1979-1984	Biologie-Studium an der Ludwig-Maximilians Uni- versität München
Abschluß		Biologie Diplom
seit	1.06.1985	Wissenschaftliche Ange- stellte am Institut für Holzforschung der Univer- sität München

